

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 474**

51 Int. Cl.:

A61K 35/50 (2015.01)
A61L 27/36 (2006.01)
C12N 5/073 (2010.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61K 35/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2011** **PCT/US2011/031335**
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011** **WO11127117**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2011** **E 11766619 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016** **EP 2556145**

54 Título: **Angiogénesis que usa células madre placentarias**

30 Prioridad:

07.04.2010 US 321822 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ABBOT, STEWART;
EDINGER, JAMES;
FRANCKI, ALEKSANDER;
HARIRI, ROBERT J.;
JANKOVIC, VLADIMIR;
KAPLUNOVSKY, ALEKSANDR;
LABAZZO, KRISTEN;
LAW, ERIC;
PADLIYA, NEERAV;
PAREDES, JENNIFER y
WANG, JIA-LUN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 602 474 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

Angiogénesis que usa células madre placentarias

1. Campo de la invención

Se proporcionan en este documento células de la placenta plástico-adherentes de cultivo de tejidos, por ejemplo células madre de la placenta, denominadas en este documento PDAC para uso en métodos para promover la angiogénesis, y para el tratamiento de enfermedades o trastornos del sistema circulatorio, por ejemplo, enfermedades o trastornos asociados o resultantes de una vascularización inadecuada o flujo sanguíneo, o tratables mediante la mejora de la angiogénesis.

2. Antecedentes

La placenta es una fuente particularmente atractiva de células madre. Debido a que las placentas de los mamíferos son abundantes y normalmente se desechan como residuos médicos, representan una fuente única de células madre médicamente útiles. Se proporcionan en este documento tales células madre aisladas de la placenta, poblaciones de células madre de la placenta, y métodos de uso de las mismas para promover la angiogénesis, y para tratar enfermedades o trastornos del sistema circulatorio, por ejemplo, enfermedades o trastornos tratables mediante la promoción de la angiogénesis.

El documento WO2010/021715 describe métodos de usos de células placentarias aisladas en el tratamiento de un individuo que padece daño hipóxico o una disfunción en el flujo de sangre dentro o alrededor del cerebro. No describe el uso de células placentarias en el tratamiento de enfermedades vasculares periféricas, enfermedades arteriales periféricas, úlcera diabética o isquemia crítica periférica. Prather William et al. (2009) se refieren a un estudio sobre el uso terapéutico of células estromales adherentes derivadas de la placenta (ASC), que no expresan CD200, en un modelo animal de una isquemia crítica periférica (CLI). El documento WO 2009/037690 A1 se refiere a métodos para tratar la isquemia y/o condiciones médicas que requieren la regeneración del tejido conectivo o la reparación usando células adherentes de tejidos adiposos o placentarios, que no expresan CD200.

3. Compendio

En un aspecto, se proporcionan en este documento métodos, en donde las células son CD10+, CD34-, CD105+ y CD200+, para uso en el tratamiento de individuos que tienen una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, en el que dicha enfermedad o trastorno del sistema circulatorio es una enfermedad vascular sistémica, enfermedad arterial periférica, úlcera diabética o isquemia periférica crítica, células de la placenta plástico-adherentes de cultivo de tejidos, por ejemplo, células madre de la placenta, también denominadas en el presente documento PDAC (células adherentes derivadas de la placenta, por ejemplo, las células adherentes derivadas de la placenta descritas en la Sección 5.2, más adelante).

Para el propósito de esta aplicación, los PDAC descritos anteriormente se denominarán "PDAC de la invención", "células de la invención", "células placentarias de la invención". Los PDAC descritos en este documento no son, sin embargo, las células adherentes de derivados del amnion descritas en la publicación de patente de Estados Unidos pendiente N° 2010/0124569, titulada "Amnion Derived Angiogenic Cells". En ciertas realizaciones, el método comprende la administración de PDAC a dicho individuo en una cantidad y durante un tiempo suficiente para la mejora detectable de uno o más indicios de dicha enfermedad o trastorno. Los indicios conocidos de la función cardíaca son gasto cardíaco torácico (CO), el índice cardíaco (CI), la presión de enclavamiento pulmonar arterial (PAWP), el índice cardíaco (IC), el % del acortamiento fraccional (% FS), la fracción de eyección (FE), la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI); el diámetro diastólico del final ventricular izquierdo (LVEDD), el diámetro sistólico del final ventricular izquierdo (LVESD), la contractilidad (dP/dt), una disminución en el funcionamiento atrial o ventricular, un aumento de la eficiencia de bombeo, una disminución en la tasa de pérdida de la eficiencia de bombeo, una disminución de la pérdida del funcionamiento hemodinámico, o la disminución de las complicaciones asociadas con la cardiomiopatía, en comparación con el individuo antes de la administración de dicho PDAC.

Una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio puede ser el infarto de miocardio o la cardiomiopatía. Una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio puede ser el aneurisma, la angina de pecho, la estenosis aórtica, aortitis, arritmias, aterosclerosis, la arteritis, la hipertrofia septal asimétrica (ASH), la aterosclerosis, la fibrilación auricular y el aleteo, endocarditis bacteriana, síndrome de Barlow (prolapso de la válvula mitral), bradicardia, la enfermedad de Buerger (tromboangiitis obliterante), cardiomegalia, la carditis, enfermedad de la arteria carótida, la coartación de la aorta, defectos congénitos del corazón, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad arterial coronaria, síndrome de Eisenmenger, la embolia, la endocarditis, eritromialgia, fibrilación, displasia fibromuscular, bloqueo cardíaco, soplo en el corazón, hipertensión, hipotensión, calcificación arterial infantil idiopática, enfermedad de Kawasaki (síndrome mucocutáneo ganglionar, enfermedad del nódulo linfático mucocutáneo, poliarteritis infantil), el síndrome metabólico, la angina microvascular, miocarditis, taquicardia auricular paroxística (PAT), periarteritis nodosa (poliarteritis, poliarteritis nodosa), pericarditis, flebitis, estenosis de la válvula pulmonar (estenosis pulmonar), enfermedad de Raynaud, la estenosis de la arteria renal, la hipertensión renovascular, la cardiopatía reumática, la vasculopatía diabética, defectos septales, isquemia silenciosa, síndrome X, taquicardia, Arteritis de Takayasu, tetralogía de Fallot, transposición de los grandes vasos, atresia tricúspide, tronco arterial, enfermedad cardíaca

valvular, úlceras varicosas, venas varicosas, vasculitis, defecto septal ventricular, síndrome de Wolff-Parkinson-White, defecto de relieve endocárdico, fiebre reumática aguda, pericarditis reumática aguda, endocarditis reumática aguda, miocarditis reumática aguda, enfermedades del corazón reumáticas crónicas, enfermedades de la válvula mitral, estenosis mitral, insuficiencia mitral reumática, enfermedades de la válvula aórtica, las enfermedades de otras

5 estructuras endocárdicas, enfermedad cardíaca isquémica (aguda y subaguda), angina de pecho, enfermedad del corazón pulmonar aguda, embolismo pulmonar, enfermedad del corazón pulmonar crónica, enfermedad cardíaca cifoesciolítica, miocarditis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibroelastosis endocárdica, bloqueo auriculoventricular, arritmias cardíacas, degeneración del miocardio, enfermedad cerebrovascular, una enfermedad de las arterias, arteriolas y capilares, o una enfermedad de las venas y los vasos linfáticos.

10 Una enfermedad o trastorno de este sistema circulación puede ser una oclusión y estenosis de las arterias precerebrales, u oclusión de las arterias cerebrales. Por tanto, se describe en este documento un método de tratamiento de un individuo que tiene una alteración del flujo de la sangre en o alrededor del cerebro del individuo, por ejemplo, que tiene un síntoma o déficit neurológico atribuible a una alteración del flujo de la sangre en o

15 alrededor el cerebro de la persona o del sistema nervioso central (SNC), que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células de la placenta aisladas (por ejemplo, PDAC). La alteración del flujo de sangre puede resultar en una lesión anóxica o lesión hipóxica al cerebro del individuo o del SNC.

De acuerdo con la invención, dicha enfermedad o trastorno de este sistema circulatorio se refiere a una oclusión y estenosis de las arterias periféricas. Por tanto, la invención se refiere al tratamiento de un individuo que tiene una alteración del flujo de sangre en o alrededor de una extremidad, por ejemplo, que tiene un síntoma o déficit vascular

20 atribuible a una alteración del flujo de sangre en o alrededor del sistema vascular periférico de la persona, usando PDAC aislados de la invención. En ciertas realizaciones, la alteración del flujo de sangre resulta en una lesión anóxica o lesión hipóxica de los miembros y/o las extremidades de la persona.

En otra realización específica de la invención, las células de la invención se administran a dicho individuo por inyección. En otra realización específica, dichas células se administran a dicho individuo por infusión intravenosa. En otra realización específica del método de tratamiento, dichas células, o una población de dichas células, o una población de células que comprenden dichas células, se administra a dicho individuo por implantación en dicho individuo de una matriz o estructura que comprende derivados de células adherentes de la placenta, como se describió anteriormente.

25

En ciertas realizaciones, las células de la placenta de la invención se administran a dicho individuo por vía intravenosa. En otras realizaciones, el uso de la invención comprende la administración de al menos

30 aproximadamente 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , o 1×10^{10} células de la placenta a dicho individuo. En otra realización específica, dichas células de la placenta, que se describen en el presente documento, se han proliferado in vitro para no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 duplicaciones de población. En otra realización específica, cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento es de un cultivo de dichas células que se ha cultivado al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 veces, o más. En otra realización de cualquiera de las realizaciones del presente documento, dichas células de la placenta han sido crioconservadas y descongeladas antes de dicha administración.

35

En otras realizaciones, dichas células placentarias han sido crioconservadas y descongeladas antes de dicho contacto.

40

De acuerdo con la invención, las células de la placenta se adhieren al plástico del cultivo de tejidos y son CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ como se detectan por citometría de flujo. En ciertas realizaciones, las células de la placenta tienen la capacidad de diferenciarse en células osteogénicas o condrogénicas. En otra realización, dichas células de la placenta son adherentes al plástico del cultivo de tejidos; CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ como se detectan por citometría de flujo; y tienen la capacidad de diferenciarse en células que tienen una o más características de células osteogénicas o condrogénicas, por ejemplo, características de osteocitos o condrocitos. En otras realizaciones, las células de la placenta, además, tienen la capacidad de diferenciarse en células que tienen una o más características de células neuronales o células neurogénicas, por ejemplo, características de las neuronas; una o más características de las células gliales, por ejemplo, características de la glía o astrocitos; una o más características de las células adipocíticas, por ejemplo, las características de los adipocitos; una o más características de las células pancreáticas; y/o una o más características de las células cardíacas.

45

50

En otra realización, dichas células de la placenta son CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y uno o más de CD38⁺, CD45⁺, CD80⁺, CD86⁺, CD133⁺, HLA-DR, DP, DQ⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, HLA-A,B,C⁺, PDL1⁺, ABC-p⁺, y/o OCT-4⁺, como se detectan por citometría de flujo y/o RT-PCR. En otra realización, dichas células de la placenta son CD34⁺, CD45⁺, CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización, dichas células de la placenta son CD34⁺, CD45⁺, CD10⁺, CD80⁺, CD86⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización, dichas células de la placenta son CD34⁺, CD45⁺, CD10⁺, CD80⁺, CD86⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y, además, uno o más de CD29⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺, como se detectan por citometría de flujo. En otra realización, dichas células

55

placentarias son CD34⁺, CD38⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD73⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺ como se detectan por citometría de flujo.

En otra realización, dichas células de la placenta CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ son, además, una o más de CD117⁺, CD133⁺, KDR⁺ (VEGFR2⁺), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁺, o ligando muerte-1 programado (PDL1)⁺, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización específica, dichas células placentarias son CD34⁺, CD38⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD73⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁺, CD133⁺, CD200⁺, KDR⁺ (VEGFR2⁺), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁺, o ligando muerte-1 programado (PDL1)⁺, como se detecta por citometría de flujo.

En otra realización, cualquiera de las células de la placenta que se describen en el presente documento son, además, ABC-p⁺, tal como se detecta mediante citometría de flujo, u OCT-4⁺ (POU5F1⁺), por ejemplo, como se determinó por RT-PCR, en la que ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)). En otra realización, cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento son, además, SSEA3⁺ o SSEA4⁺, por ejemplo, tal como se determina por citometría de flujo, en el que SSEA3 es el antígeno embrionario específico de etapa 3, y SSEA4 es el antígeno embrionario específico de etapa 4. En otra realización, cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento son, además, SSEA3⁺ y SSEA4⁺.

En otra realización de los métodos descritos en el presente documento, cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento son, además, una o más de MHC-I⁺ (por ejemplo, HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁺ (por ejemplo, HLA-DP,DQ,DR⁺) o HLA-G⁺. En otra realización, cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento son, además, cada una de MHC-I⁺ (por ejemplo, HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁺ (por ejemplo, HLA-DP,DQ,DR⁺) y HLA-G⁺.

En otra realización, las células CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son, además, una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, CD80⁻, CD86⁻, SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización, las células son, además, CD44⁺. En otra realización, las células CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ de la placenta son, además, una o más de CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁺, CD144/VE-cadherina^{inferior}, CD184/CXCR4⁺, CD133⁺, OCT-4⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, ABC-p⁺, KDR⁺ (VEGFR2⁺), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁺, HLA-G⁺, o ligando muerte-1 programado (PDL1)⁺, o cualquier combinación de las mismas. En otra realización, las células CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ de la placenta son, además, CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁺, CD144/VE-cadherina^{dim}, CD184/CXCR4⁺, CD133⁺, OCT-4⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, ABC-p⁺, KDR⁺ (VEGFR2⁺), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁺, HLA-G⁺, y ligando muerte-1 programado (PDL1)⁺.

En otras realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, las células de la placenta aisladas son CD200⁺ y HLA-G⁺; CD73⁺, CD105⁺ y CD200⁺; CD200⁺ y OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺; CD73⁺ y CD105⁺; u OCT-4⁺, o cualquier combinación de las mismas.

En ciertas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, las células de la placenta aisladas son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, OCT-4⁺, MHC-I⁺ o ABC-p⁺, donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a la mitoxantrona (MXR)). En otra realización, las células de la placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, y OCT-4⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺ y SH4⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, MHC-I⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺. En otra realización, las células de la placenta son aislados OCT-4⁺ y ABC-p⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁺, SSEA3⁺, y SSEA4⁺. En una realización específica, dichas células OCT-4⁺, CD34⁺, SSEA3⁺, y SSEA4⁺ son, además, CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺ y SH4⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺ y CD34⁺, y, o bien SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son CD34⁺ y tanto CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, u OCT-4⁺. En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺ y CD200⁺.

En otra realización, las células de la placenta aisladas útiles en los métodos descritos en este documento son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁺, CD104⁺, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-cadherina^{dim}, CD184/CXCR4⁺, β2-microglobulina^{dim}, MHC-I^{dim}, MHC-II⁺, HLA-G^{dim}, y/o PDLL^{dim}. En ciertas realizaciones, tales células de la placenta son al menos CD29⁺ y CD54⁺. En otra realización, dichas células de la placenta aisladas son al menos CD44⁺ y CD106⁺. En otra realización, dichas células de la placenta aisladas son al menos CD29⁺.

En ciertas realizaciones de cualquiera de las características anteriores, la expresión del marcador celular (por ejemplo, grupo de diferenciación o marcador inmunogénico) se determina por citometría de flujo. En ciertas otras realizaciones, la expresión del marcador celular se determina por RT-PCR.

En otra realización, dichas células de la placenta útiles en los métodos descritos en este documento, por ejemplo, dichas células CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺, expresan uno o más genes en un nivel detectable mayor que un número equivalente de las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, en el que dichos uno o más genes son uno o más de ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, 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 el que dichas células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea han sido objeto de una serie de pasajes en cultivo equivalentes a la cantidad de pasajes que dichas células placentarias aisladas han sido sometidas. En ciertas realizaciones, dicha expresión de dicho uno o más genes se determina, por ejemplo, por RT-PCR o análisis de microarrays, por ejemplo, utilizando un microarray U133-A (Affymetrix). En otra realización, dichas células de la placenta aisladas expresan dichos uno o más genes cuando se cultivan para, por ejemplo, cualquier lugar desde aproximadamente 3 a aproximadamente 35 duplicaciones de la población, en un medio que comprende 60% de DMEM-LG (por ejemplo, de Gibco) y 40% de MCDB- 201 (por ejemplo, de Sigma); 2% de suero de ternera fetal (por ejemplo, de Hyclone Labs.); 1x insulina transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovina (LA-BSA); dexametasona 10⁻⁹ M (por ejemplo, de Sigma); ácido 2-fosfato ascórbico 10⁻⁴ M (por ejemplo, de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems). En otra realización, dichas células de la placenta aisladas expresan dichos uno o más genes cuando se cultivan para de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 duplicaciones de la población en un medio que comprende 60% de DMEM-LG (por ejemplo, de Gibco) y 40% de MCDB-201 (por ejemplo, de Sigma); 2% de suero de ternera fetal (por ejemplo, de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-suero de albúmina bovina (LA-BSA); dexametasona 10⁻⁹ M (por ejemplo, de Sigma); ácido 2-fosfato ascórbico 10⁻⁴ M (Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems).

En ciertas realizaciones, las células placentarias expresan CD200 y ARTS1 (Regulador de la aminopeptidasa del factor de necrosis tumoral tipo 1); ARTS-1 y LRAP (arginina aminopeptidasa derivada de leucocitos); IL6 (interleucina-6) y TGFB2 (factor de crecimiento transformante, beta 2); IL6 y KRT18 (queratina 18); IER3 (respuesta temprana inmediata 3), MEST (homólogo de transcritos específicos de mesodermo) y TGFB2; CD200 y IER3; CD200 e IL6; CD200 y KRT18; CD200 y LRAP; CD200 y MEST; CD200 y NFE2L3 (factor nuclear (derivado de eritroide 2) - como 3); o CD200 y TGFB2 a un nivel detectable mayor que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC) en el que dichas células madre mesenquimales derivadas de médula ósea han sido objeto de una serie de pasajes en cultivo equivalente a la cantidad de pasajes que dichas células de la placenta aisladas han sido sometidas. En otras realizaciones, las células de la placenta expresan ARTS-1, CD200, IL6 y LRAP; ARTS-1, IL6, TGFB2, IER3, KRT18 y MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, y TGFB2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, y TGFB2; o IER3, MEST y TGFB2 a un nivel detectable mayor que un número equivalente de las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea BM-MSC, en el que dichas células madre mesenquimales derivadas de médula ósea han sufrido una serie de pasajes en cultivo equivalente al número de pasajes que dichas células placentarias aisladas han sido sometidas.

Cuando se usan células humanas, las denominaciones de genes completamente se refieren a secuencias humanas, y, como es bien conocido para los expertos en la técnica, las secuencias representativas se pueden encontrar en la literatura, o en el GenBank. Las sondas a las secuencias se pueden determinar mediante las secuencias que son públicamente disponibles, o a través de fuentes comerciales, por ejemplo, sondas TaqMan® específicas o matriz de angiogénesis TaqMan® (Applied Biosystems, parte nº. 4378710).

En diversas realizaciones, dichas células de la placenta aisladas útiles en los métodos descritos en este documento, por ejemplo, las células madre de la placenta o las células multipotentes de la placenta, están contenidas dentro de una población de células, al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células de las cuales son dichas células placentarias aisladas. En ciertas otras realizaciones, las células de la placenta en dicha población de células están sustancialmente libres de células que tienen un genotipo de la madre; por ejemplo, al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células de la placenta de dicha población tienen un genotipo fetal, es decir, son fetales en su origen. En ciertas otras realizaciones, la población de células que comprende dicha células placentarias están sustancialmente libres de células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células de dicha población tienen un genotipo fetal, es decir, son fetales en su origen. En ciertas otras realizaciones, la población de células que comprende dichas células de la placenta comprenden células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicha población tienen un genotipo de la madre, es decir, son de origen materno.

En una realización de cualquiera de las realizaciones de las células de la placenta (por ejemplo, PDAC) en el presente documento, las células de la placenta facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrioides en una

población de células de la placenta que comprenden dichas células aisladas de la placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo tipo embrioide, por ejemplo, un cultivo bajo condiciones de proliferación).

En ciertas realizaciones, las células de la placenta (por ejemplo, PDAC) útiles en los métodos proporcionados en este documento, no expresan CD34⁺, como se detecta por inmunolocalización, después de la exposición a de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En una realización específica, dichas células adherentes de la placenta son adherentes al plástico del cultivo de tejidos. En otra realización específica, dicha población de células forma brotes o estructuras similares a tubos cuando se cultivan en presencia de un factor angiogénico, tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), por ejemplo, en un sustrato tal como MATRIGELTM.

En otro aspecto, los PDAC de esta invención, una población de células, por ejemplo, una población de PDAC, o una población de células en la que al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las células en dicha población aislada de células son PDAC, secretan uno o más, o todos, de VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, o galectina-1, por ejemplo, en un medio de cultivo en el que la célula, o las células, se cultivan. En otra realización, los PDAC expresan niveles mayores de CD202b, IL-8 y/o VEGF en condiciones de hipoxia (por ejemplo, menos de aproximadamente 5% de O₂) en comparación con condiciones de normoxia (por ejemplo, aproximadamente 20% o aproximadamente 21% de O₂).

En otra realización, cualquiera de los PDAC o poblaciones de células que comprenden los PDAC descritos en este documento puede causar la formación de brotes o estructuras similares a tubos en una población de células endoteliales en contacto con dichas células adherentes placentarias derivadas. En una realización específica, las células angiogénicas placentarias derivadas son co-cultivadas con células endoteliales humanas, formando brotes o estructuras similares a tubos, o apoyan los brotes de células endoteliales, por ejemplo, cuando se cultivan en presencia de proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno tipo I y IV, y/o factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), por ejemplo, en o sobre un sustrato tal como el colágeno de placenta o MATRIGELTM durante al menos 4 días.

En ciertas realizaciones de cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento, las células son humanas.

En ciertas realizaciones, cualquiera de las células de la placenta, por ejemplo, las células madre de la placenta o las células multipotentes placentarias descritas en este documento, son autólogas respecto a un destinatario. En ciertas otras realizaciones, cualquiera de las células de la placenta, por ejemplo, las células madre de la placenta o las células multipotentes placentarias descritas en este documento, son heterólogas respecto a un destinatario.

En ciertas realizaciones, las células de la placenta son criopreservadas antes de dicha administración. En otra realización, dichas células de la placenta aisladas se obtienen a partir de un banco de células de la placenta (por ejemplo, un banco PDAC).

En cualquiera de las realizaciones anteriores de células de la placenta aisladas, las células de la placenta aisladas generalmente no se diferencian durante el cultivo en medio de crecimiento, es decir, el medio formulado para promover la proliferación, por ejemplo, durante la proliferación en medio de crecimiento. En otra realización, dichas células de la placenta aisladas no requieren una capa de alimentación con el fin de proliferar. En otra realización, dichas células placentarias aisladas no se diferencian en el cultivo únicamente como el resultado del cultivo en ausencia de una capa de células de alimentación.

En ciertas realizaciones, dichas células de la placenta aisladas se obtienen por perfusión de una placenta obtenida después del parto que se ha drenado de la sangre y perfundido para eliminar la sangre residual; drenado de la sangre, pero no perfundido para eliminar la sangre residual; o ni drenado de la sangre, ni perfundido para eliminar la sangre residual. En otra realización específica, dichas células aisladas de la placenta se obtienen por ruptura física y/o enzimática del tejido de la placenta.

La superficie celular, los marcadores moleculares y genéticos de las células de la placenta, útiles en los métodos proporcionados en este documento, se describen con detalle en la sección 5.2 a continuación.

En otra realización específica de los métodos descritos anteriormente, dichas células de la placenta aisladas se administran por inyección en bolo. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas se administran por infusión intravenosa. En una realización específica, dicha infusión intravenosa es una infusión intravenosa durante aproximadamente 1 a aproximadamente 8 horas. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas se administran por vía intracraneal. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas se administraron por vía intraperitoneal. En otra realización específica, dichas células aisladas de la placenta se administran por vía intraarterial. En otra realización específica del método de tratamiento, dichas células placentarias aisladas se administran por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, intratecal o intraocular.

En otra realización de los métodos descritos anteriormente, dichas células placentarias aisladas se administran por implantación quirúrgica en dicho individuo de una composición de materia que comprende dichas células de la placenta aisladas. En una realización específica, dicha composición de materia es una matriz o estructura. En otra realización específica, dicha matriz o estructura es un hidrogel. En otra realización específica, dicha matriz o estructura es un tejido descelularizado. En otra realización específica, dicha matriz o estructura es una composición biodegradable sintética. En otra realización específica, dicha matriz o estructura es una espuma.

En otra realización específica de los métodos descritos anteriormente, dichas células placentarias aisladas se administran una vez a dicho individuo. En otra realización específica, dichas células aisladas de la placenta se administran a dicho individuo en dos o más administraciones separadas. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente 1×10^4 y 1×10^5 células de la placenta aisladas, por ejemplo, células de la placenta por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente 1×10^5 y 1×10^6 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente 1×10^6 y 1×10^7 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^7 y 1×10^8 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otras realizaciones específicas, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 2×10^6 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 2×10^6 y aproximadamente 3×10^6 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 3×10^6 y aproximadamente 4×10^6 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 4×10^6 y aproximadamente 5×10^6 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 5×10^6 y aproximadamente 6×10^6 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 6×10^6 y aproximadamente 7×10^6 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 7×10^6 y aproximadamente 8×10^6 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 8×10^6 y aproximadamente 9×10^6 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo; o entre aproximadamente 9×10^6 y aproximadamente 1×10^7 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 2×10^7 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo a dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente $1,3 \times 10^7$ y aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo a dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de hasta aproximadamente 3×10^7 células de la placenta aisladas por kilogramo de dicho individuo a dicho individuo. En una realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente 5×10^6 y aproximadamente 2×10^7 células placentarias aisladas a dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de aproximadamente 150×10^6 células de la placenta aisladas en aproximadamente 20 ml de solución a dicho individuo.

En una realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 5×10^6 y aproximadamente 2×10^7 células placentarias aisladas a dicho individuo, en el que dichas células están contenidas en una solución que comprende 10% de dextrano, por ejemplo, dextrano-40, 5% de albúmina de suero humano, y, opcionalmente, un inmunosupresor.

En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente 5×10^7 y 3×10^9 células de la placenta aisladas por vía intravenosa. En realizaciones específicas, dicha administración comprende administrar aproximadamente 9×10^8 células de la placenta aisladas o aproximadamente $1,8 \times 10^9$ células de la placenta aisladas por vía intravenosa. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 5×10^7 y 1×10^8 células de la placenta aisladas dentro de la lesión. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de 9×10^7 células de la placenta aisladas dentro de la lesión.

Las células de la placenta usadas en los métodos proporcionados en este documento pueden, en ciertas realizaciones, ser diseñadas genéticamente para producir una o más proteínas que faciliten la angiogénesis. En ciertas realizaciones, dichas proteínas que facilitan la angiogénesis son una o más del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (por ejemplo, VEGFD), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, FGF2), angiogenina (ANG), factor de crecimiento epidérmico (EGF), proteína epitelial-activadora de neutrófilos 78 (ENA-78), folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), proteína oncofénica de crecimiento regulado (GRO), interleucina-6 (IL-6), IL-8, la leptina, proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), MCP-3, factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad B (PDGFB), rantes, factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), trombopoietina (Tpo), inhibidor tisular de las metaloproteinasas 1 (TIMP1), TIMP2, y/o el receptor del activador de plasminógeno uroquinasa (uPAR).

3.1. Definiciones

En la presente memoria, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor numérico indicado, indica un valor dentro de más o menos 10% del valor numérico indicado.

Tal como se utiliza en este documento, el término "angiogénico", en referencia a las células adherentes placenta derivadas descritas en este documento, significa que las células pueden formar vasos o brotes de vasos similares, o que las células pueden promover la angiogénesis (por ejemplo, la formación de vasos o de estructuras similares a vasos) en otra población de células, por ejemplo, células endoteliales.

- 5 Tal como se utiliza en este documento, el término "angiogénesis" se refiere al proceso de formación de vasos sanguíneos que incluye, pero no se limita a, la activación de células endoteliales, la migración, la proliferación, la remodelación de la matriz y la estabilización de células.

- 10 Tal como se utiliza en este documento, el término "derivado" significa aislado o de otra forma purificado. Por ejemplo, las células adherentes derivadas de la placenta son aisladas de la placenta. El término "derivado" abarca células que son cultivadas a partir de células aisladas directamente de un tejido, por ejemplo, la placenta, y las células cultivadas o expandidas de aislados primarios.

- 15 En la presente memoria, "localización inmune" significa la detección de un compuesto, por ejemplo, un marcador celular, utilizando una proteína inmune, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo en, por ejemplo, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia, clasificación celular magnética, hibridación in situ, inmunohistoquímica, o similares.

Tal como se utiliza en este documento, el término "SH2" se refiere a un anticuerpo que se une a un epítipo en el marcador celular CD105. De este modo, las células que se conocen como SH2⁺ son CD105⁺.

Como se usa en este documento, los términos "SH3" y "SH4" se refieren a anticuerpos que se unen a epítopos presentes en el marcador celular CD73. De este modo, las células que se conocen como SH3⁺ y/o SH4⁺ son CD73⁺.

- 20 Una placenta no solo tiene el genotipo del feto que se desarrolla dentro de ella, sino que también está en contacto físico cercano con tejidos maternos durante la gestación. Como tal, como se usa en este documento, la expresión "genotipo fetal" significa el genotipo del feto, por ejemplo, el genotipo del feto asociado con la placenta de la cual células placentarias aisladas particulares, como se describe en el presente documento, se obtienen, en comparación con el genotipo de la madre que lleva el feto. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "genotipo materno"
- 25 significa el genotipo de la madre que lleva el feto, por ejemplo, el feto asociado con la placenta de la que células placentarias aisladas particulares, como se describe en el presente documento, se obtienen.

- 30 En la presente memoria, la expresión "célula aislada", por ejemplo, "célula aislada de placenta", "célula madre de la placenta aislada", y similares, significa una célula que está separada sustancialmente de otras células diferentes del tejido, por ejemplo, placenta, de la que la célula madre se deriva. Una célula está "aislada" si al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o al menos 99% de las células, por ejemplo, no células madre, con las que la célula madre está naturalmente asociada, o células madre que muestran un perfil de marcador diferente, se eliminan de la célula madre, por ejemplo, durante la recogida y/o el cultivo de las células madre.

- 35 Como se usa en este documento, "multipotente", cuando se refiere a una célula, significa que la célula tiene la capacidad de diferenciarse en algunos, pero no necesariamente todos, tipos de células del cuerpo, o en células que tienen características de algunos, pero no todos, tipos de células del cuerpo, o en células de una o más de las tres capas germinales. En ciertas realizaciones, por ejemplo, una célula aislada de placenta (PDAC), como se describe en la Sección 5.2, más abajo, que tiene la capacidad de diferenciarse en una célula que tiene las características de las células neurogénicas, condrogénicas y/o osteogénicas es una célula multipotente.

- 40 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "población de células aisladas" significa una población de células que está separada sustancialmente de otras células de un tejido, por ejemplo, placenta, de la que la población de células se deriva.

- 45 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "célula placentaria" se refiere a una célula madre o célula progenitora que se aísla a partir de una placenta de mamíferos, por ejemplo, como se describe en la Sección 5.2, más abajo, o se cultiva a partir de células aisladas de una placenta de mamíferos, también denominadas en el presente documento como "PDAC", ya sea como un aislado primario o una célula cultivada, sin importar el número de pasajes después de un cultivo primario. En ciertas realizaciones, la expresión "células de la placenta" como se usa en el presente documento, sin embargo, no se refiere a las células de la placenta usadas en los métodos proporcionados en este documento y no son, sin embargo, trofoblastos, citotrofoblastos, sincitiotrofoblasto, angioblastos, hemangioblastos, células germinales embrionarias, células madre embrionarias, células obtenidas a partir de una masa celular interna de un blastocisto, o células obtenidas a partir de una cresta gonadal de un embrión tardío, por ejemplo, una célula germinal embrionaria. Las células de la placenta, por ejemplo, PDAC, que se describen en este documento no son las células adherentes amnio derivadas descritas en la publicación de patente pendiente de Estados Unidos N° 2010/0124569, titulada "Amnion Derived Angiogenic Cells". Una célula se considera una "célula madre" si la célula muestra atributos de una célula madre, por ejemplo, un marcador o perfil de expresión
- 50 génica asociado con uno o más tipos de células madre; la capacidad de replicarse por lo menos 10-40 veces en el cultivo, y la capacidad de diferenciarse en células que presentan características de células diferenciadas de una o más de las tres capas germinales. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, el término
- 55

"placenta" incluye el cordón umbilical. Las células placentarias aisladas descritas en este documento, en ciertas realizaciones, se diferencian in vitro en condiciones de diferenciación, se diferencian in vivo, o ambos.

Tal como se usa en el presente documento, una célula de placenta es "positiva" para un marcador particular cuando ese marcador es detectable por encima de la línea de fondo. La detección de un marcador particular puede, por ejemplo, llevarse a cabo ya sea mediante el uso de anticuerpos, o por sondas de oligonucleótidos o cebadores basados en la secuencia del gen o ARNm que codifica el marcador. Por ejemplo, una célula de placenta es positiva para, por ejemplo, CD73 porque CD73 es detectable en células de la placenta en una cantidad mayor de forma detectable que la línea de fondo (en comparación con, por ejemplo, un control de isotipo). Una célula también es positiva para un marcador cuando ese marcador se puede utilizar para distinguir la célula de al menos otro tipo de células, o se puede utilizar para seleccionar o aislar la célula cuando está presente o se expresa por la célula. En el contexto de, por ejemplo, la detección mediada por anticuerpos, "positiva", cuando una indicación de un marcador de superficie celular particular está presente, significa que el marcador es detectable usando un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo marcado fluorescentemente, específico para ese marcador; "positiva" también se refiere a una célula que presenta el marcador en una cantidad que produce una señal, por ejemplo, en un citómetro, que es detectable por encima de la línea de fondo. Por ejemplo, una célula es "CD200⁺", cuando la célula es marcada de manera detectable con un anticuerpo específico frente a CD200, y la señal del anticuerpo es detectablemente más alta que la de un control (por ejemplo, la línea de fondo o un control de isotipo). A la inversa, "negativa" en el mismo contexto significa que el marcador de superficie celular no es detectable utilizando un anticuerpo específico para ese marcador comparado con un control (por ejemplo, la línea de fondo o un control de isotipo). Por ejemplo, una célula es "CD34⁺", cuando la célula no está marcada de manera reproducible y detectable con un anticuerpo específico para CD34 en un grado mayor que un control (por ejemplo, la línea de fondo o un control de isotipo). Los marcadores no detectados, o no detectables, usando anticuerpos se determinan que son positivos o negativos de una manera similar, usando un control apropiado. Por ejemplo, una célula o población de células se puede determinar que es OCT-4⁺ si la cantidad de ARN de OCT-4 detectado en el ARN de la célula o la población de células es de forma detectable mayor que el fondo tal como se determina, por ejemplo, por un método de detección de ARN tal como RT-PCR, transferencias de ranura, etc. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, se detectan los marcadores de grupo de diferenciación ("CD") usando anticuerpos. En ciertas realizaciones, OCT-4 se determina que está presente, y una célula es "OCT-4⁺" si OCT-4 es detectable mediante RT-PCR.

Tal como se usa en el presente documento, la designación "bajo", cuando se refiere a la expresión de un marcador detectable en citometría de flujo, significa que el marcador se expresa en menos del 10% de células analizadas, o que la fluorescencia atribuible al marcador en, por ejemplo, citometría de flujo, está a menos de 1 log por encima de la línea de fondo.

Como se usa en el presente documento, "tratar" abarca la remediación, la mejora, disminución de la gravedad, o la reducción en el transcurso del tiempo de una enfermedad, un trastorno o una afección, o cualquier parámetro o síntoma de la misma.

4. Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la secreción de proteínas angiogénicas seleccionadas por las células adherentes derivadas de la placenta.

La figura 2 muestra el efecto angiogénico de medio acondicionado de células adherentes derivadas de la placenta en la formación del tubo de células endoteliales humanas (HUVEC).

La figura 3 muestra el efecto angiogénico de medio acondicionado de células adherentes derivadas de la placenta sobre la migración de células endoteliales humanas.

La figura 4 muestra el efecto del medio acondicionado de células adherentes derivadas placentarias sobre la proliferación de células endoteliales humanas.

La figura 5 muestra la formación de tubos de HUVEC y las células adherentes derivadas de la placenta.

La figura 6 muestra la secreción de VEGF y de IL-8 por células adherentes derivadas de la placenta bajo condiciones hipóxicas y de normoxia.

La figura 7 muestra el efecto positivo de PDAC sobre la angiogénesis en modelo de angiogénesis de membrana corioalantoidea de pollo. bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico (control positivo). MDAMB231: línea celular de cáncer de mama angiogénico (control positivo). Eje Y: grado de formación de vasos sanguíneos.

La figura 8 muestra el efecto positivo de medio acondicionado PDAC (sobrenadantes) sobre la angiogénesis en un modelo de angiogénesis de corioalantoides de pollo. bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico (control positivo). MDAMB231: línea celular de cáncer de mama angiogénico (control positivo). Eje Y: grado de formación de vasos sanguíneos.

Figura 9: Especies reactivas de oxígeno generadas por peróxido de hidrógeno presentes en cultivos de astrocitos, o co-cultivos de astrocitos y PDAC. Actividad ROS RFU: unidades de fluorescencia relativa de las especies reactivas de oxígeno.

5. Descripción detallada

- 5 La presente invención proporciona una población de células adherentes derivadas de la placenta que son CD10+, CD34-, CD05+, y CD200+, como se determina por citometría de flujo, para uso en un método para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, en donde enfermedad o trastorno del sistema circulatorio es una enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, úlcera diabética o isquemia periférica crítica.
- 10 De acuerdo con la presente invención, los síntomas de dicha enfermedad vascular periférica son frío, hormigueo en pies que se vuelven rojos al colgarlos; dolor; o debilidad y cansancio en las piernas. Además, de acuerdo con la presente invención, los síntomas de dicha isquemia periférica crítica son dolor de reposo isquémico; dolor severo en las piernas y pies mientras el individuo no está en movimiento; llagas que no sanan en los pies o las piernas; dolor o entumecimiento en los pies; piel brillante, suave, seca de las piernas o pies; engrosamiento de las uñas de los pies; pulso ausente o bajo en las piernas o los pies; llagas abiertas; infecciones de la piel o úlceras que no sanan; o gangrena seca de las piernas o los pies.

De acuerdo con la presente invención, las células adherentes derivadas de la placenta son además una o más de CD45-, o CD90+, como se detecta por citometría de flujo. Además, de acuerdo con la presente invención, las células adherentes derivadas de la placenta son además OCT-4+, como se detecta por RT-PCR.

- 20 De acuerdo con la presente invención, las células adherentes derivadas de la placenta son administradas intravenosamente, intra-arterialmente, intramuscularmente, intradérmicamente, o subcutáneamente. Además, de acuerdo con la presente invención, aproximadamente 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , o 1×10^{10} de dichas células adherentes derivadas de la placenta son administradas.

5.1 Angiogénesis y tratamiento de enfermedades o estados asociados o resultantes de la mala circulación sanguínea

- En el presente documento se proporcionan, para uso en métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos del sistema circulatorio en donde dicha enfermedad o trastorno del sistema circulatorio es la enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, úlcera diabética o isquémica periférica crítica, células de la placenta adherentes al plástico de cultivo de tejidos, por ejemplo, PDAC, como se describe en la Sección 5.2, más adelante.
- 30 En ciertas realizaciones, las PDAC son angiogénicas. Las PDAC son capaces de apoyar el crecimiento de las células endoteliales y las poblaciones de células endoteliales, y las células epiteliales y las poblaciones de células epiteliales, tanto in vitro como in vivo.

5.1.1 Enfermedades del sistema circulatorio

- Las PDAC, poblaciones de tales células, y las poblaciones de células que comprenden PDAC, proporcionadas en este documento pueden usarse para tratar a individuos que exhiben una variedad de estados o condiciones de enfermedad que se beneficiarían de un aumento de la angiogénesis. Ejemplos de tales estados o condiciones de enfermedad incluyen infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad arterial periférica, síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, úlcera diabética, úlcera de decúbito, úlceras venosas, úlceras arteriales, quemaduras, fractura de no unión, la osteoartritis y la reparación del hueso maxilofacial. Las PDAC, y las poblaciones de dichas células, pueden, en ciertas realizaciones, ser utilizadas para promover la angiogénesis en los individuos que presentan pérdida de tejido traumática, o para prevenir la formación de cicatrices, o en individuos que tienen reemplazo total de la articulación o prótesis dentales.

- Más específicamente, las PDAC, y las poblaciones de dichas células, proporcionadas en este documento, se pueden utilizar para el tratamiento de un individuo que tiene una insuficiencia del sistema circulatorio, por ejemplo, un individuo que tiene enfermedad vascular periférica o enfermedad de la arteria coronaria.

- Se describen en el presente documento métodos para tratar a un paciente con una enfermedad cardíaca o lesión comprende la administración de una composición celular terapéutica a un paciente con una enfermedad o lesión del corazón o el sistema circulatorio, y la evaluación del paciente para la mejora de la función cardíaca, en el que dicha composición celular comprende las PDAC como se describen en el presente documento. La enfermedad cardíaca puede ser una cardiomiopatía. La miocardiopatía puede ser o bien idiopática o una cardiomiopatía con una causa conocida. La cardiomiopatía es ya sea isquémica o no isquémica en la naturaleza. La enfermedad del corazón o del sistema circulatorio puede comprender una o más de angioplastia, aneurisma, angina (angina de pecho), estenosis aórtica, aortitis, arritmias, arterioesclerosis, arteritis, hipertrofia septal asimétrica (ASH), aterosclerosis, fibrilación auricular y aleteo, endocarditis bacteriana, síndrome de Barlow (prolapso de la válvula mitral), bradicardia, enfermedad de Buerger (tromboangiitis obliterante), cardiomegalia, cardiomiopatía, carditis, enfermedad de la arteria carótida, coartación de la aorta, enfermedades congénitas del corazón (defectos congénitos del corazón), insuficiencia cardíaca congestiva (insuficiencia cardíaca), enfermedad de la arteria coronaria, síndrome de

Eisenmenger, embolia, endocarditis, eritromialgia, fibrilación, displasia fibromuscular, bloqueo cardíaco, soplo cardíaco, hipertensión, hipotensión, calcificación arterial infantil idiopática, enfermedad de Kawasaki (síndrome mucocutáneo ganglionar, enfermedad del nódulo linfático mucocutáneo, poliarteritis infantil), síndrome metabólico, angina microvascular, infarto de miocardio (ataques al corazón), miocarditis, taquicardia auricular paroxística (PAT),
 5 periarteritis nodosa (poliarteritis, poliarteritis nodosa), pericarditis, enfermedad vascular periférica, isquemia crítica de las extremidades, vasculopatía diabética, flebitis, estenosis de la válvula pulmonar (estenosis pulmonar), enfermedad de Raynaud, estenosis de la arteria renal, hipertensión renovascular, cardiopatía reumática, defectos septales, isquemia silenciosa, síndrome X, taquicardia, arteritis de Takayasu, tetralogía de Fallot, transposición de los grandes vasos, atresia tricúspide, tronco arterial, enfermedad cardíaca valvular, úlceras varicosas, venas
 10 varicosas, vasculitis, defecto septal ventricular, síndrome de Wolff-Parkinson-White o defecto de relieve endocárdico.

Además, la enfermedad del corazón o del sistema circulatorio comprende una o más de fiebre reumática aguda, pericarditis reumática aguda, endocarditis reumática aguda, miocarditis reumática aguda, enfermedades del corazón reumáticas crónicas, enfermedades de la válvula mitral, estenosis mitral, insuficiencia mitral reumática, enfermedades de la válvula aórtica, enfermedades de otras estructuras endocárdicas, enfermedad cardíaca
 15 isquémica (subaguda y aguda), angina de pecho, enfermedades de la circulación pulmonar (enfermedad cardíaca pulmonar aguda, embolia pulmonar, enfermedades del corazón pulmonar crónica), enfermedad del corazón cifoescoliótica, miocarditis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibroelastosis endocardial, bloqueo auriculoventricular, arritmias cardíacas, degeneración miocárdica, enfermedades del sistema circulatorio incluyendo la enfermedad cerebrovascular, la oclusión y estenosis de las arterias precerebrales, la oclusión de las arterias
 20 cerebrales, enfermedades de las arterias, arteriolas y capilares (aterosclerosis, aneurisma), o enfermedades de venas y vasos linfáticos.

El tratamiento de un individuo con una cardiomiopatía con una composición celular terapéutica que comprende PDAC puede ser ya sea con o sin otro tipo de célula. El individuo experimenta los beneficios de la terapia, por ejemplo la capacidad de las células de apoyar el crecimiento de otras células, incluyendo las células madre o células
 25 progenitoras presentes en el corazón, desde el crecimiento de tejido o la vascularización del tejido, y la presencia de factores beneficiosos celulares, quimiocinas, citocinas y similares, pero las células no se integran o se multiplican en el individuo. Alternativamente, el paciente se beneficia del tratamiento terapéutico con las células, pero las células no sobreviven durante un período prolongado en el paciente. Las células pueden disminuir gradualmente en número, viabilidad o actividad bioquímica. La disminución de las células puede ser precedida por un periodo de actividad, por
 30 ejemplo de crecimiento, división, o actividad bioquímica. Las células no viables, senescentes o incluso muertas son capaces de tener un efecto terapéutico beneficioso.

La mejora de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, en el que al individuo se administra las PDAC o composiciones terapéuticas de la invención, se puede evaluar o demostrar por la mejora detectable en uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno del sistema circulatorio.

La mejora de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, en el que al individuo se administra las PDAC o composiciones terapéuticas que comprenden las PDAC, se puede evaluar o demostrar por la mejora detectable en uno o más indicios de la función cardíaca, por ejemplo, la demostración de la mejora detectable en uno o más gasto cardíaco de pecho (CO), índice cardíaco (CI), presiones de enclavamiento de la
 35 arteria pulmonar (PAWP), y el índice cardíaco (CI), % de la fracción de acortamiento (% FS), la fracción de eyección (EF), la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI); diámetro diastólico del final ventricular izquierdo (LVEDD), diámetro de sístole del fin del ventrículo izquierdo (LVESD), la contractilidad (por ejemplo dP/dt), bucles presión-volumen, las mediciones del trabajo cardíaco, un aumento en el funcionamiento atrial o ventricular; un aumento en la eficiencia de bombeo, una disminución en la tasa de pérdida de la eficiencia de bombeo, una disminución de la pérdida del funcionamiento hemodinámico; y una disminución de las complicaciones asociadas
 40 con la cardiomiopatía, en comparación con el individuo antes de la administración de las PDAC.

La mejora en un individuo que recibe las PDAC, o composiciones terapéuticas que comprenden PDAC, proporcionada en este documento también se puede evaluar mediante indicadores subjetivos, por ejemplo, la autoevaluación del individuo acerca de su estado de salud después de la administración.

El éxito de la administración de las células no es, en ciertas realizaciones, en base a la supervivencia en el individuo de las PDAC administradas. El éxito es, en cambio, sobre la base de una o más indicios de la mejora en la salud
 50 cardíaca o circulatoria, como se señaló anteriormente. Por lo tanto, las células no necesitan integrarse y batir con el corazón del paciente, o en los vasos sanguíneos.

Las PDAC pueden inducirse para diferenciarse a lo largo de linaje mesenquimal, por ejemplo, hacia un fenotipo cardiomiogénico, angiogénico o vasculogénico, o en células, tales como miocitos, cardiomiocitos, células
 55 endoteliales, células miocárdicas, células epicárdicas, células endoteliales vasculares, células musculares lisas (por ejemplo, células vasculares del músculo liso).

La administración de PDAC, o las composiciones terapéuticas que comprenden tales células, a un individuo en necesidad del mismo, se puede lograr, por ejemplo, mediante el trasplante, la implantación (por ejemplo, de las propias células o las células como parte de una combinación de células de la matriz), inyección (por ejemplo,

directamente al sitio de la enfermedad o afección, por ejemplo, directamente a un sitio isquémico en el corazón de un individuo que ha sufrido un infarto de miocardio), la infusión, la entrega a través de catéter, o cualquier otro medio conocido en la técnica para proporcionar terapia celular.

- 5 En una realización, las composiciones de células terapéuticas se proporcionan a un individuo en necesidad del mismo, por ejemplo, por inyección en uno o más sitios en el individuo. Por ejemplo, las composiciones de células terapéuticas pueden ser proporcionadas por inyección intracardiaca, por ejemplo, a un área isquémica en el corazón. Alternativamente, se pueden inyectar las células en la superficie del corazón, en un área adyacente, o incluso en una zona más remota. En realizaciones preferidas, las células pueden alojarse en la zona enferma o lesionada.
- 10 A un individuo que tiene una enfermedad o condición del sistema vascular o coronario se le puede administrar PDAC en cualquier momento que las células sean terapéuticamente beneficiosas. En ciertas realizaciones, por ejemplo, las PDAC o composiciones terapéuticas de la invención se administran a las 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 a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 días del infarto de miocardio. La administración proximal en el tiempo a un infarto de miocardio, por ejemplo, a los 1-3 ó 1-7 días, es preferible la administración distal en el tiempo, por ejemplo, después de 3 ó 7 días después de un infarto de miocardio. En otras realizaciones, las células o las composiciones terapéuticas de la invención se administran a las 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 a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 días del diagnóstico inicial de la enfermedad o condición.
- 15 También se describen en este documento kits para uso en el tratamiento de un infarto de miocardio. Los kits proporcionan una composición celular terapéutica que comprende PDAC, que se pueden preparar en una forma farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, mediante la mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un aplicador, junto con instrucciones de uso. Idealmente, el kit se puede utilizar in situ, por ejemplo en un consultorio médico, o por un proveedor de servicios de emergencia para ser aplicado a un paciente diagnosticado como que ha tenido un infarto de miocardio o evento cardíaco similar.
- 20 En realizaciones específicas de los métodos de tratamiento, las PDAC se administran con células madre (es decir, células madre que no son PDAC), mioblastos, miocitos, cardiomioblastos, cardiomiocitos, o progenitores de mioblastos, miocitos, cardiomioblastos, y/o cardiomiocitos.
- 25 Las PDAC, por ejemplo, una composición terapéutica que comprende las células, pueden ser administradas a un paciente con una enfermedad del corazón o del sistema circulatorio; y la evaluación del paciente para la mejora de la función cardíaca, en el que la composición de células terapéutica se administra como un complejo de células de la matriz. En ciertas realizaciones, la matriz es una estructura, preferiblemente bioabsorbible, que comprende al menos las células.
- 30 Con este fin, las poblaciones de PDAC pueden ponerse en contacto con, por ejemplo, incubados o cultivados en presencia de uno o más factores que estimulan la diferenciación de células madre o progenitoras a lo largo de una vía cardiogénica, angiogénica, hemangiogénica, o vasculogénica. Tales factores incluyen, pero no se limitan a factores, tales como factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas, productos celulares, agentes de desmetilación, y otros factores que se conocen ahora o más tarde determinados para estimular la diferenciación, por ejemplo de células madre, a lo largo de vías o linajes cardiogénicos, angiogénicos, hemangiogénicos, o vasculogénicos.
- 35 Las PDAC pueden diferenciarse a lo largo de vías o linajes cardiogénicos, angiogénicos, hemangiogénicos, o vasculogénicos in vitro por el cultivo de las células en presencia de factores que comprenden al menos uno de un agente de desmetilación, una BMP (proteína morfogenética ósea), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), la proteína del factor Wnt, la proteína Hedgehog, y/o un factor anti-Wnt.
- 40 La inclusión de agentes de desmetilación tiende a promover la diferenciación de PDAC a lo largo de las líneas mesenquimales, hacia una vía cardiomiogénica. La diferenciación se puede determinar mediante, por ejemplo, la expresión de al menos uno de cardiomyosina, miosina esquelética, o GATA4, por ejemplo, tal como se determina por inmunotinción o RT-PCR; o mediante la adquisición de un ritmo de latido, espontáneo o inducido de otro modo; o por la capacidad de integrarse por lo menos parcialmente en el músculo cardíaco de un individuo sin inducir arritmias. Los agentes de desmetilación que se pueden utilizar para iniciar dicha diferenciación incluyen, pero no se limitan a,
- 45 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, dimetilsulfóxido, cloruro de queleritrina, ácido retinoico o sales de los mismos, ácido 2- amino-4-(etililo)butírico, procainamida, y/o procaina.
- 50 Las PDAC puestas en contacto con uno o más factores identificados anteriormente pueden convertirse en células cardiomiogénicas, angiogénicas, hemangiogénicas, o vasculogénicas, o progenitores. Preferiblemente, al menos algunas de las células se integran al menos parcialmente en un sistema cardiovascular del receptor incluyendo, pero no limitado a músculo cardíaco, vascular y otras estructuras del corazón, los vasos sanguíneos cardíacos o periféricos, y similares. En ciertas realizaciones, las PDAC diferenciadas se diferencian en células que presentan dos o más características de las células cardiomiogénicas o sus progenitores, y son capaces de integrarse total o
- 55 parcialmente en el corazón o la vasculatura de un destinatario. En realizaciones específicas, las células, cuando se

administran a un individuo, dan lugar a ningún aumento de arritmias, defectos del corazón, defectos de los vasos sanguíneos u otras anomalías del sistema circulatorio del individuo o su salud. En ciertas realizaciones, las PDAC actúan para promover la diferenciación de las células madre presentes de forma natural en el músculo cardíaco del paciente, vasos sanguíneos, sangre, o similares, se diferencian en sí mismas en, por ejemplo, cardiomiocitos, o al menos a lo largo de líneas cardiomiogénicas, angiogénicas, hemangiogénicas o vasculogénicas.

Las PDAC, y las poblaciones de tales células, se pueden proporcionar terapéuticamente o profilácticamente a un individuo, por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o condición o que afecte al corazón o al sistema circulatorio. Dichas enfermedades, trastornos o condiciones pueden incluir la insuficiencia cardíaca congestiva debido a aterosclerosis, cardiomiopatía, o lesión cardíaca, por ejemplo, una lesión isquémica, tal como de infarto de miocardio o de herida (aguda o crónica).

En ciertas realizaciones, al individuo se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de PDAC, por ejemplo, en una población de células que comprende las PDAC. En una realización específica, la población comprende aproximadamente 50% de PDAC. En otra realización específica, la población es una población sustancialmente homogénea de PDAC. En otras realizaciones la población comprende al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de PDAC.

Las PDAC se pueden administrar a un individuo en forma de una composición terapéutica que comprende las células y otro agente terapéutico, tal como el factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), la interleuquina 18 (IL-18), un agente antitrombogénico (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, o PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), un compuesto de la antitrombina, un antagonista del receptor de plaquetas, un anticuerpo anti-trombina, un anticuerpo del receptor antiplaquetario, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, un inhibidor de la prostaglandina, y/o un inhibidor de plaquetas), un agente antiapoptótico (por ejemplo, la eritropoyetina (Epo), un análogo o derivado de Epo, o sus sales, trombopoyetina (TPO), IGF-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o un inhibidor de la caspasa), un agente anti-inflamatorio (por ejemplo, un inhibidor de la quinasa MAP p38, una estatina, un inhibidor de IL-6, un inhibidor de IL-1, pemirolast, tranilast, Remicade, Sirolimus, y o un compuesto anti-inflamatorio no esteroideo (por ejemplo, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, Tepoxalin, tolmetina, o Suprofen)), un agente inmunosupresor o inmunomodulador (por ejemplo, un inhibidor de calcineurina, por ejemplo ciclosporina, tacrolimus, una inhibidor de mTOR tal como sirolimus o everolimus; un antiproliferativo tal como la azatioprina y/o micofenolato de mofetilo; un corticosteroide, por ejemplo, prednisolona o hidrocortisona; un anticuerpo tal como un anticuerpo del receptor monoclonal anti-IL-2R α , Basiliximab, Daclizuma, anticuerpos policlonales anti-células T tales como anti-timocitos globulina (ATG), anti-linfocitos globulina (ALG), y/o el anticuerpo monoclonal OKT3 anti-células T, o células madre de la placenta adherentes como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.468.276, y la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. de publicación 2007/ 0275362), y/o un antioxidante (por ejemplo, probucol; vitaminas A, C, y/o E, coenzima Q-10, el glutatión, L cisteína, N acetilcisteína, o un derivado antioxidante, análogo o sal de cualquiera de los anteriores). En ciertas realizaciones, las composiciones terapéuticas que comprenden las PDAC comprenden además uno o más tipos de células, por ejemplo, células adultas (por ejemplo, fibroblastos o células endodérmicas), células madre y/o células progenitoras. Dichos agentes terapéuticos y/o uno o más tipos de células se pueden administrar a un individuo en necesidad de los mismos de forma individual o en combinaciones, o dos o más de tales compuestos o agentes.

En ciertas realizaciones, el individuo a tratar es un mamífero. En una realización específica el individuo a ser tratado es un ser humano. En realizaciones específicas, el individuo es un animal de ganado o un animal doméstico. En otras realizaciones específicas, el individuo a tratar es un caballo, oveja, vaca o buey, cerdo, perro o gato.

5.1.2 Tratamiento de enfermedad isquémica

Se proporcionan en este documento las PDAC de la invención para uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene una alteración del flujo de sangre, por ejemplo, en la vasculatura periférica, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de PDAC. En ciertas realizaciones específicas, la isquemia es la enfermedad arterial periférica (PAD), por ejemplo, es isquemia crítica de las extremidades (CLI). En ciertas otras realizaciones, la isquemia es la enfermedad vascular periférica (PVD).

En una realización específica, dicha disrupción del flujo de la sangre es la isquemia crítica de las extremidades. En otra realización más específica, dicha CLI es una obstrucción severa de las arterias de las extremidades inferiores, lo que reduce notablemente el flujo de sangre. En otra realización más específica, dicha CLI se caracteriza por dolor isquémico en reposo, dolor severo en las piernas y los pies, mientras que el individuo no está en movimiento, úlceras que no cicatrizan en los pies o en las piernas, dolor o entumecimiento en los pies, piel brillante, lisa y seca de las piernas o los pies, engrosamiento de las uñas de los pies, pulso ausente o disminuido en las piernas o los pies, llagas abiertas, infecciones de la piel o úlceras que no cicatrizan, y/o gangrena seca (piel negra seca) de las piernas o los pies. En otra realización específica, el individuo que tiene CLI ha experimentado pérdida de al menos un dedo y/o extremidad conjunta. En otra realización específica del método, dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de PDAC que resulta en la eliminación, una mejora detectable, disminución de la gravedad, o ralentización de la progresión de uno o más síntomas de la pérdida de la función del miembro y/o privación de

oxígeno (hipoxia/anoxia) atribuible a una alteración del flujo de sangre en la vasculatura periférica de la persona. En otra realización específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de PDAC aisladas se administra a dicho individuo profilácticamente, por ejemplo, para reducir o eliminar el daño tisular causado por una segunda o subsiguiente alteración del flujo de la sangre en o alrededor de la extremidad siguiente a dicha alteración del flujo de sangre.

- 5 Las PDAC también se pueden usar en el tratamiento del accidente cerebrovascular, por ejemplo, accidente cerebrovascular isquémico, por ejemplo, el tratamiento de accidente cerebrovascular en la promoción de la angiogénesis en un área isquémica del SNC. En un aspecto, un individuo que tiene una alteración del flujo de la sangre en o alrededor del cerebro del individuo, por ejemplo, que tiene un síntoma o déficit neurológico atribuible a una alteración del flujo de la sangre en o alrededor del cerebro de la persona o del sistema nervioso central (SNC),
 10 puede tratarse administrando a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células de la placenta humanas plástico adherentes aisladas de cultivo de tejidos, en el que dichas células placentarias aisladas tienen características de células multipotentes o de células madre. La alteración del flujo de sangre puede resultar en una lesión anóxica o lesión hipóxica al cerebro del individuo o del SNC. Como se contempla en el presente documento, el tratamiento de un síntoma o déficit neurológico en un individuo atribuible a una alteración del flujo de la sangre en o alrededor del cerebro del individuo incluye el tratamiento de los síntomas o déficits neurológicos atribuibles a una lesión por reperfusión que puede acompañar a una dicha alteración del flujo de la sangre en o alrededor del cerebro del individuo.

Además de ser angiogénicas, las células de la placenta (por ejemplo, PDAC, como se describe más adelante) proporcionadas en este documento son neuroprotectoras. En ciertas realizaciones, las células de la placenta son
 20 neuroprotectoras en un ambiente bajo en oxígeno, por ejemplo, bajo condiciones de hipoxia (por ejemplo, menos de aproximadamente 5% de O₂). En ciertas realizaciones, las células madre de la placenta, cuando entran en contacto con las neuronas u otras células neurales, o astrocitos, aumentan la salud de las neuronas, células neuronales, o astrocitos, por ejemplo, como se ve por un aumento en la longitud de las neuritas in vitro en un co-cultivo de PDAC y neuronas. En ciertas otras realizaciones, las PDAC reducen la concentración de una o más especies reactivas de
 25 oxígeno en un ambiente hipóxico. Además, en cierta realización, las células placentarias (por ejemplo, PDAC) secretan una o más de las citoquinas neurotróficas BDNF, VEGF, HGF, G-CSF, factor de crecimiento nervioso (NGF), y/o neurotrofina-3 (Ntf3). Como tal, las PDAC son útiles en el tratamiento de lesión isquémica, tanto para el sistema nervioso central como para el PNS, por ejemplo, lesión isquémica en el sistema nervioso en el SNC resultante de accidente cerebrovascular o lesión isquémica en el sistema nervioso en el PNS resultante de isquemia crítica de las extremidades o de la enfermedad vascular periférica. Las PDAC se pueden utilizar para tratar, por
 30 ejemplo, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y/o las neuropatías periféricas, por ejemplo, la neuropatía diabética.

5.2 Células placentarias aisladas y poblaciones de células placentarias aisladas

35 Las células placentarias aisladas, por ejemplo, PDAC, útiles en el tratamiento de individuos que tienen una enfermedad circulatoria o trastorno, son células que pueden obtenerse a partir de una placenta o parte de la misma, que se adhieren a un sustrato de cultivo de tejidos y tienen características de células multipotentes o células madre, pero no son trofoblastos. En ciertas realizaciones, las células placentarias aisladas útiles en los métodos descritos en este documento tienen la capacidad de diferenciarse en tipos de células no placentarias.

Las células placentarias aisladas útiles en los métodos descritos en este documento pueden ser o bien fetales o
 40 maternas en origen (es decir, pueden tener el genotipo de ya sea del feto o de la madre, respectivamente). Preferiblemente, las células y poblaciones placentarias aisladas de las células de la placenta aisladas son fetales en su origen. En la presente memoria, la frase "fetal en origen" o "no de origen materno" indica que las células placentarias aisladas o poblaciones de células de la placenta aisladas se obtienen a partir del cordón umbilical o estructuras de la placenta asociadas con el feto, es decir, que tienen el genotipo fetal. Tal como se usa en el
 45 presente documento, la frase "de origen materno" indica que las células o poblaciones de células se obtienen de estructuras de la placenta asociadas con la madre, por ejemplo, que tienen el genotipo de la madre. Las células placentarias aisladas, por ejemplo, PDAC, o poblaciones de células que comprenden las células placentarias aisladas, pueden comprender células placentarias aisladas que son únicamente fetales o maternas en origen, o pueden comprender una población mixta de células placentarias aisladas de origen tanto fetal como maternal. Las
 50 células placentarias aisladas, y las poblaciones de células que comprenden las células placentarias aisladas, pueden ser identificadas y seleccionadas por la morfológica, el marcador, y las características de cultivo discutidas a continuación. En ciertas realizaciones, cualquiera de las células de la placenta, por ejemplo, las células madre de la placenta o células multipotentes placentarias descritas en este documento, son autólogas a un receptor, por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio. En ciertas otras realizaciones,
 55 cualquiera de las células de la placenta, por ejemplo, las células madre de la placenta o células multipotentes placentarias descritas en este documento, son heterólogas a un receptor, por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio.

5.2.1 Características físicas y morfológicas

60 Las células placentarias aisladas descritas en este documento (PDAC), cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato del cultivo de tejidos, por ejemplo, a la superficie del recipiente de cultivo de

- tejidos (por ejemplo, cultivo de tejidos de plástico), o a una superficie de cultivo de tejidos recubierta con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL® (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)). Las células de la placenta aisladas en cultivo asumen un aspecto estrellado, generalmente fibroblastoide, con un número de procesos citoplásmicos que se extienden desde el cuerpo celular central. Las células son, sin embargo, morfológicamente distinguibles de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que las células placentarias aisladas exhiben un mayor número de estos procesos que lo hacen lo fibroblastos. Morfológicamente, las células de la placenta aisladas son también distinguibles de las células madre hematopoyéticas, que generalmente asumen una morfología más redondeada, o de adoquines, en cultivo.
- En ciertas realizaciones, las células placentarias aisladas útiles en los métodos descritos en este documento, cuando se cultivan en un medio de crecimiento, desarrollan cuerpos tipo embrionarios. Los cuerpos tipo embrionarios son masas contiguas de células que pueden crecer en la parte superior de una capa adherente de la proliferación de las células placentarias aisladas. La expresión "tipo embrionario" se utiliza debido a que los grupos de células se asemejan a cuerpos embrioides, grupos de células que crecen a partir de cultivos de células madre embrionarias. El medio de cultivo en el que los cuerpos tipo embrionarios pueden desarrollarse en un cultivo de proliferación de células de la placenta aisladas incluye un medio que comprende, por ejemplo, DMEM-LG (por ejemplo, de Gibco); 2% de suero de ternera fetal (por ejemplo, de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovina (LA-BSA); dexametasona 10^{-9} M (por ejemplo, de Sigma); ácido ascórbico 2-fosfato 10^{-4} M (por ejemplo, de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/mL (por ejemplo, de R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems).

5.2.2 Marcadores de la superficie celular, moleculares y genéticos

- Las células placentarias aisladas, por ejemplo, células placentarias aisladas multipotentes o células madre de la placenta aisladas, y las poblaciones de dichas células placentarias aisladas, útiles en los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, los métodos de tratamiento de una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, son células placentarias humanas adherentes al plástico de cultivo de tejidos que tienen características de células multipotentes o células madre, y expresan una pluralidad de marcadores que se pueden utilizar para identificar y/o aislar las células, o poblaciones de células que comprenden las células madre. En ciertas realizaciones, las PDAC son angiogénicas, por ejemplo, in vitro o in vivo. Las células de la placenta aisladas, y las poblaciones de células placentarias descritas en el presente documento (es decir, dos o más células de la placenta aisladas) incluyen células de la placenta y poblaciones de células que contienen células placentarias obtenidas directamente de la placenta, o parte de ella (por ejemplo, corion, cotiledones placentarios, o similares). Las poblaciones de células placentarias aisladas también incluyen poblaciones de (es decir, dos o más) células de la placenta aisladas en el cultivo, y una población en un recipiente, por ejemplo, una bolsa. Las células placentarias aisladas descritas en este documento no son células mesenquimales derivadas de la médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, o células mesenquimatosas obtenidas de la sangre del cordón umbilical, sangre de la placenta, o sangre periférica. Las células de la placenta, por ejemplo, las células multipotentes de la placenta y células de la placenta, útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento se describen en el presente documento y, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 7.311.904; 7.311.905; y 7.468.276; y en la Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2007/0275362.
- Las PDAC de la invención son $CD10^+$, $CD34^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$, como se determina por citometría de flujo. En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son células madre aisladas de la placenta. En ciertas otras realizaciones, las células de la placenta aisladas son células multipotentes placentarias aisladas. En una realización, las células placentarias aisladas, por ejemplo, PDAC, son $CD34^+$, $CD10^+$ y $CD105^+$ como se detecta por citometría de flujo. En otra realización específica, las células $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas de la placenta tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo neuronal, células de un fenotipo osteogénico, y/o células de un fenotipo condrogénico. En otra realización específica, las células $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas de la placenta son, además, $CD200^+$. En otra realización específica, las células $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas de la placenta son, además, $CD45^-$ o $CD90^+$. En otra realización específica, las células $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas de la placenta son, además, $CD45^-$ y $CD90^+$, como se detectan por citometría de flujo. En otra realización específica, las células $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ aisladas de la placenta son, además, $CD90^+$ o $CD45^-$, como se detecta por citometría de flujo. En otra realización específica, las células $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ aisladas de la placenta son, además, $CD90^+$ y $CD45^-$, como se detecta por citometría de flujo, es decir, las células son $CD34^+$, $CD10^+$, $CD45^-$, $CD90^+$, $CD105^+$ y $CD200^+$. En otra realización específica, dichas células $CD34^+$, $CD10^+$, $CD45^-$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ son, además, $CD80^-$ y $CD86^-$.
- En ciertas realizaciones, dichas células placentarias son $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ y $CD200^+$, y una o más de $CD38^-$, $CD45^-$, $CD80^-$, $CD86^-$, $CD133^-$, HLA-DR, DP, DQ, SSEA3, SSEA4, $CD29^+$, $CD44^+$, $CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, HLA-A, B, C, PDL1, ABC-p y/o OCT-4, como se detecta por citometría de flujo. En otras realizaciones, cualquiera de las células $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ descritas anteriormente son adicionalmente una o más de $CD29^+$, $CD38^-$, $CD44^+$, $CD54^+$, SH3 o SH4. En otra realización específica, las células son, además, $CD44^+$. En otra realización específica de cualquiera de las células $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas de la placenta anteriormente, las células son, además, una o más de $CD117^-$, $CD133^-$, KDR (VEGFR2), HLA-A, B, C, HLA-DP, DQ, DR, o ligando muerte-1 programado (PDL1), o cualquier combinación de los mismos.

- En otra realización, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son, además, una o más de CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{inferior}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, o ligando muerte-1 programado (PDL1)⁺, o cualquier combinación de los mismos. En una otra realización, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son, además, CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106 VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{inferior}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, y el ligando muerte-1 programado (PDL1)⁺.
- En otra realización específica, cualquiera de las células de la placenta que se describen en el presente documento son, además, ABC-p⁺, tal como se detecta mediante citometría de flujo, u OCT-4⁺ (POU5F1⁺), según lo determinado por RT-PCR, en la que ABC-p es una proteína de placenta específica del transportador ABC (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)), y OCT-4 es la proteína Octámero-4 (POU5F1). En otra realización específica, cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento son, además, SSEA3⁻ o SSEA4⁻, como se determina mediante citometría de flujo, en el que SSEA3 es el antígeno embrionario específico de etapa 3, y SSEA4 es el antígeno embrionario específico de etapa 4. En otra realización específica, cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento son, además, SSEA3⁻ y SSEA4⁻.
- En otra realización específica, cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento son, además, una o más de MHC-I⁺ (por ejemplo, HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁺ (por ejemplo, HLA-DP,DQ,DR⁺) o HLA-G⁻. En otra realización específica, cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento son, además, una o más de MHC-I⁺ (por ejemplo, HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁺ (por ejemplo, HLA-DP,DQ,DR⁺) y HLA-G⁻.
- También se proporcionan en este documento poblaciones de las células placentarias aisladas, o poblaciones de células, por ejemplo, poblaciones de células de la placenta, que comprenden, por ejemplo, que están enriquecidas en las células placentarias aisladas, que son útiles en los métodos y las composiciones descritas en este documento. Las poblaciones preferidas de células que comprenden las células de la placenta aisladas, en las que las poblaciones de células comprenden, por ejemplo, al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% células CD10⁺, CD105⁺ y CD34⁺ aisladas de la placenta; es decir, al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de las células en dicha población son células CD10⁺, CD105⁺ y CD34⁺ aisladas de la placenta. En una realización específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas de la placenta son adicionalmente CD200⁺. En otra realización específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas de la placenta son, además, CD90⁺ o CD45⁻, como se detecta por citometría de flujo. En otra realización específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas de la placenta son, además, CD90⁺ y CD45⁻, como se detecta por citometría de flujo. En otra realización específica, cualquiera de las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas de la placenta descritas anteriormente son adicionalmente una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas de la placenta, o las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas de la placenta, son, además, CD44⁺. En una realización específica de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas de la placenta anteriormente, las células placentarias aisladas son, además, una o más de CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{inferior}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, o el ligando de Muerte-1 programado (PDL1)⁺, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son, además, CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{inferior}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, y el ligando de Muerte-1 programado (PDL1)⁺.
- En ciertas realizaciones, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritas en la presente invención son una o más, o todas, de CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, y ABC-p⁺, en el que dichas células placentarias aisladas se obtienen por medios físicos y/o alteración enzimática del tejido placentario. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺ y ABC-p⁺. En otra realización específica, las células placentarias aisladas son OCT-4⁺ y CD34⁻, en el que dichas células de la placenta aisladas tienen al menos una de las siguientes características: CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺ y CD34⁻, y tanto SH2⁺ como SH3⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, SH2⁺ y SH3⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻, y son bien SH2⁺ o SH3⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺ y CD34⁻, y, o bien SH2⁺ o SH3⁺, y es por lo menos una de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻ o SSEA4⁻. En otra realización específica,

las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁺, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁺ y SSEA4⁺, y, o bien SH2⁺ o bien SH3⁺.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, CD34⁺, CD45⁺, SSEA3⁺, o SSEA4⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁺ y SSEA4⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁺ y SSEA4⁺, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, OCT-4⁺, CD34⁺ o CD45⁺.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺ y SH4⁺; en el que dichas células placentarias aisladas son, además, una o más de OCT-4⁺, SSEA3⁺ o SSEA4⁺.

En ciertas realizaciones, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritas en este documento son CD200⁺ o HLA-G⁺. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son CD200⁺ y HLA-G⁺. En otra realización específica, las células placentarias aisladas son, además, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, las células placentarias aisladas son, además, CD34⁺, CD38⁺ o CD45⁺. En otra realización específica, las células placentarias aisladas son, además, CD34⁺, CD38⁺ y CD45⁺. En otra realización específica, dichas células madre son células CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células CD200⁺ o HLA-G⁺ aisladas de la placenta facilitan la formación de cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta, que comprende las células placentarias aisladas, en condiciones que permitan la formación de cuerpos tipo embrionarios. En otra realización específica, las células placentarias aisladas se aíslan lejos de las células de la placenta que no son células madre o multipotentes. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas se aíslan lejos de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones descritas en el presente documento es una población de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en células madre CD200⁺, HLA-G⁺. En una realización específica, dicha población es una población de células de la placenta. 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 las células en dicha población de células son células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas placentarias. Preferiblemente, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas de la placenta. Más preferiblemente, al menos aproximadamente 90%, 95%, o 99% de dichas células son células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas de la placenta. En una realización específica de las poblaciones de células, dichas células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas placentarias también son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas placentarias también son CD34⁺, CD38⁺ o CD45⁺. En otra realización específica, dichas células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas de la placenta también son CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización, dicha población de células produce una o más cuerpos tipo embrionarios cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrionarios. En otra realización específica, la población de células se aísla a distancia de las células de la placenta que no son las células madre. En otra realización específica, dichas células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas placentarias se aíslan lejos de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son CD73⁺, CD105⁺, y CD200⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son HLA-G⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD34⁺, CD38⁺ o CD45⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD34⁺, CD38⁺ y CD45⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, y HLA-G⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, y CD200⁺ facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta, que comprende las células placentarias aisladas, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrionarios. En otra realización específica, las células placentarias aisladas se aíslan lejos de las células de la placenta que no son las células de la placenta aisladas. En otra realización específica, las células placentarias aisladas se aíslan lejos de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una población de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20% o, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60% de células en dicha población son células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺. En otra realización, al menos aproximadamente 70% de dichas células en dicha población de células son células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺. En otra realización, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺. En una realización específica de dichas poblaciones, las células de la placenta aisladas son HLA-G⁺. En otra realización específica, las células placentarias aisladas son, además, CD34⁺, CD38⁺ o CD45⁺. En otra realización específica, las células placentarias aisladas son, además, CD34⁺, CD38⁺ y CD45⁺. En otra realización específica, las células placentarias aisladas son, además, CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺ y HLA-G⁺. En otra

realización específica, dicha población de células produce uno o más cuerpos embrionarios, cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrionarios. En otra realización específica, dicha población de células de la placenta se aísla lejos de las células de la placenta que no son las células madre. En otra realización específica, dicha población de células de la placenta se aísla lejos de las células placentarias que no muestran estas características.

En ciertas otras realizaciones, las células de la placenta aisladas son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, OCT-4⁺, HLA-G⁺ o ABC-p⁺. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, y OCT-4⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺ y SH4⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD90⁺, HLA-G⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺ y ABC-p⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁺, SSEA3⁺ y SSEA4⁺. En una realización específica, dichas células de la placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁺, SSEA3⁺ y SSEA4⁺, además, CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, y SH4⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4⁺ y CD34⁺, y, o bien SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización, las células de la placenta aisladas son tanto CD34⁺ como CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, u OCT-4⁺.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son CD200⁺ y OCT-4⁺. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas son HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son CD34⁺, CD38⁺ o CD45⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son CD34⁺, CD38⁺ y CD45⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ facilitan la producción de uno o más cuerpos tipo embrionarios por una población de células de la placenta, que comprende las células aisladas, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrionarios. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son aisladas lejos de las células placentarias que no son las células madre. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son aisladas lejos de las células placentarias que no muestran estas características.

En otra realización, una población de células útil en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una población de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en células de la placenta CD200⁺, OCT-4⁺. 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 las células en dicha población de células son células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺. En otra realización, al menos aproximadamente el 70% de dichas células son dichas células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺. En otra realización, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, o 99% de las células en dicha población de células aisladas son dichas células de la placenta CD200⁺, OCT-4⁺. En una realización específica de las poblaciones aisladas, dichas células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son, además, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son, además, HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son, además, CD34⁺, CD38⁺ y CD45⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son, además, CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otra realización específica, la población de células produce una o más cuerpos tipo embrionarios cuando se cultivan en condiciones que permitan la formación de cuerpos tipo embrionarios. En otra realización específica, la población de células se aísla lejos de las células de la placenta que no son las células de la placenta aisladas CD200⁺, OCT-4⁺. En otra realización específica, dicha población de células se aísla lejos de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺ son, además, CD34⁺, CD38⁺ o CD45⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ son, además, CD34⁺, CD38⁺ y CD45⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ son, además, OCT-4⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ son, además, CD200⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ son, además, CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ facilitan la formación de cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta que comprende dichas células, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrionarios. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ son aisladas lejos de las células placentarias que no son las células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ son aisladas lejos de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones descritas en el presente documento es una población de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻. 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 células en dicha población de las células son células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻. En otra realización, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻. En otra realización, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% o de células en dicha población de células son células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ son, además, CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ son, además, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ son, además, OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ son, además, CD200⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ son, además, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra realización específica, dicha población celular se aísla lejos de las células placentarias que no son células de la placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻. En otra realización específica, la población de células se aísla lejos de células de la placenta que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son CD73⁺ y CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta aisladas que comprende dichas células CD73⁺, CD105⁺ cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrionarios. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ son, además, CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ son, además, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ son, además, OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ son, además, OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ se aíslan lejos de células de la placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ son aisladas lejos de las células placentarias que no muestran estas características.

En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una población de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en células de la placenta aisladas que son CD73⁺, CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células placentarias aisladas que comprenden dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrionarios. 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 las células en dicha población de las células aisladas son dichas células de la placenta CD73⁺, CD105⁺. En otra realización, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺. En otra realización, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de células en dicha población de células son dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ son, además, CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ son, además, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ son, además, OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ son, además, CD200⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺ son, además, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra realización específica, la población de células se aísla lejos de dichas células de la placenta que no son dichas células de la placenta aisladas CD73⁺, CD105⁺. En otra realización específica, la población de células se aísla lejos de las células de la placenta que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son OCT-4⁺ y facilitan la formación de una o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta aisladas que comprende dichas células cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrionarios. En una realización específica, dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺ son, además, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺ son, además, CD34⁻, CD38⁻, o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺ son, además, CD200⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺ son, además, CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺ son aisladas lejos de las células placentarias que no son células de la placenta OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺ son aisladas lejos de las células placentarias que no muestran estas características.

En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una población de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en células de la placenta aisladas que son OCT-4⁺ y facilitan la formación de una o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células placentarias aisladas que comprenden dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrionarios. 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 células en dicha población de las células aisladas son dichas células de la placenta OCT-4⁺. En otra realización, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺. En otra realización, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99% de células en dicha población de células son dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺ son, además, CD34⁺, CD38⁺ o CD45⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺ son, además, CD34⁺, CD38⁺ y CD45⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺ son, además, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺ son, además, CD200⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas OCT-4⁺ son, además, CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁺, CD38⁺, y CD45⁺. En otra realización específica, la población de células se aísla lejos de células de la placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dicha población de células se aísla lejos de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento son células de la placenta aisladas HLA-A,B,C⁺, CD45⁺, CD133⁺ y CD34⁺. En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una población de células que comprende células de la placenta aisladas, en el que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de las células en dicha población aislada de células son células de la placenta aisladas, HLA-A,B,C⁺, CD45⁺, CD133⁺ y CD34⁺. En una realización específica, dicha célula placentaria aislada o población de células placentarias aisladas se aísla lejos de células de la placenta que no son células de la placenta HLA-A,B,C⁺, CD45⁺, CD133⁺ y CD34⁺. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas no son de origen materno. En otra realización específica, dicha población aislada de células de la placenta están sustancialmente libres de componentes maternos; por ejemplo, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población aislada de células de la placenta no son de origen materno.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento son células de la placenta aisladas CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁺, CD117⁺ y CD133⁺. En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una población de células que comprende células de la placenta aisladas, en el que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de las células en dicha población de células son células de la placenta aisladas CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁺, CD117⁺ y CD133⁺. En una realización específica, dichas células placentarias aisladas o población de células placentarias aisladas se aísla lejos de las células de la placenta que no son dichas células de la placenta aisladas. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁺, CD117⁺ y CD133⁺ no son de origen materno, es decir, tienen el genotipo fetal. En otra realización específica, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población aislada de células de la placenta, no son de origen materno. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas o población de células placentarias aisladas son aisladas lejos de las células placentarias que no muestran estas características.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son células de la placenta aisladas CD10⁺, CD33⁺, CD44⁺, CD45⁺, y CD117⁺. En otra realización, una población de células útiles para los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una población de células que comprende, por ejemplo, están enriquecidos en células de la placenta aisladas, en el que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de las células en dicha población de células son células de la placenta aisladas CD10⁺, CD33⁺, CD44⁺, CD45⁺, y CD117⁺. En una realización específica, dicha célula placentaria aislada o población de células placentarias aisladas se aísla lejos de las células de la placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas no son de origen materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población de células son de origen no materno. En otra realización específica, dicha célula placentaria aislada o población de células placentarias aisladas se aísla lejos de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son células de la placenta aisladas CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁺, y CD117⁺. En otra realización, una población de células útil en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una población de células que comprende, por ejemplo, están enriquecida en células de la placenta aisladas CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁺, y CD117⁺, en el que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de las células en dicha población son células de la placenta CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁺, y CD117⁺. En una realización específica, dichas células placentarias aisladas o población de células placentarias aisladas se aíslan lejos de las células de la placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas no son de origen materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,

75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población de células no son de origen materno. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas o población de células placentarias aisladas se aísla lejos de las células placentarias que no muestran estas características.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son HLA A,B,C⁺, CD45⁺, CD34⁺, y CD133⁺, y son, además, CD10⁺, CD13⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ y/o HLA-G⁺, y/o negativo para CD117. En otra realización, una población de células útiles en los métodos descritos en este documento es una población de células que comprende células de la placenta aisladas, en el que al menos aproximadamente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%) o aproximadamente el 99% de las células en dicha población son células de la placenta aisladas que son HLA A,B,C⁺, CD45⁺, CD34⁺, CD133⁺, y que, además, son positivas para CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200, y/o negativas para CD117 y/o HLA-G. En una realización específica, dichas células placentarias aisladas o población de células de la placenta aisladas son aisladas lejos de las células placentarias que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas no son de origen materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población de células no son de origen materno. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas o población de células placentarias aisladas son aisladas lejos de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son células de la placenta aisladas que son CD200⁺ y CD10⁺, según lo determinado por la unión del anticuerpo, y CD117⁺, como se determina tanto por la unión del anticuerpo como por RT-PCR. En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son células de la placenta aisladas, por ejemplo, las células madre de la placenta o células multipotentes de la placenta, que son CD10⁺, CD29⁺, CD54⁺, CD200⁺, HLA-G⁺, MHC de clase I⁺ y β-2-microglobulina⁺. En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son células de la placenta en las que la expresión de al menos un marcador celular es al menos dos veces mayor que para una célula madre mesenquimal (por ejemplo, una célula madre mesenquimal derivada de la médula ósea). En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas no son de origen materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población de células no son de origen materno.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son células aisladas de la placenta, por ejemplo, células madre de la placenta o células multipotentes de la placenta, que son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54/ICAM⁺, CD62E⁺, CD62L⁺, CD62P⁺, CD80⁺, CD86⁺, CD103⁺, CD104⁺, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-cadherina^{inferior}, CD184/CXCR4^{inferior}, β2-microglobulina^{inferior}, MHC-I^{inferior}, MHC-II^{inferior}, HLA-G^{inferior}, y/o PDLL^{inferior}. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son al menos CD29⁺ y CD54⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son al menos CD44⁺ y CD106⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son al menos CD29⁺.

En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente invención comprende células aisladas de la placenta, y al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicha población de células son células de la placenta aisladas que son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁺, CD62-L⁺, CD62-P⁺, CD80⁺, CD86⁺, CD103⁺, CD104⁺, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-cadherina^{dim}, CD184/CXCR4^{dim}, β2-microglobulina^{dim}, HLA-I^{dim}, HLA-II^{dim}, HLA-G^{dim}, y/o PDLL^{dim}. En otra realización específica, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicha población de células son CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁺, CD62-L⁺, CD62-P⁺, CD80⁺, CD86⁺, CD103⁺, CD104⁺, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-cadherina^{dim}, CD184/CXCR4^{dim}, β2-microglobulina^{dim}, MHC-I^{dim}, MHC-II^{dim}, HLA-G^{dim}, y PDLL^{dim}.

En otra realización, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son células de la placenta aisladas que son una o más, o todas, de CD10⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, OCT-4⁺, y ABC-p⁺, donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)), en el que dichas células placentarias aisladas se obtienen por perfusión de la placenta de un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que se ha drenado de sangre del cordón umbilical y perfundido para eliminar sangre residual.

En otra realización específica de cualquiera de las características anteriores, la expresión del marcador celular (por ejemplo, el grupo de diferenciación o el marcador inmunogénico) se determina por citometría de flujo; en otra realización específica, la expresión del marcador se determina por RT-PCR.

El perfil de los genes confirma que las células placentarias aisladas, y las poblaciones de células placentarias aisladas, se distinguen de otras células, por ejemplo, células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. Las células placentarias aisladas descritas en este documento se pueden distinguir de, por ejemplo, las células madre mesenquimales en base a la expresión de uno o más genes,

expresión de la cual es significativamente más alta en las células de la placenta aisladas, o en ciertas células madre de cordón umbilical aisladas, en comparación con la células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. En particular, las células placentarias aisladas, útiles en los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento, se pueden distinguir de las células madre mesenquimales en base a la expresión de uno o más genes, expresión de la cual es significativamente mayor (es decir, al menos dos veces superior) en las células de la placenta aisladas que en un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, en las que uno o más genes 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, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A, o una combinación de cualquiera de los anteriores, cuando se cultivan las células en condiciones equivalentes. Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de patente de EE.UU. No. 2007/0275362. En ciertas realizaciones específicas, dicha expresión de dicho uno o más genes se determina, por ejemplo, por RT-PCR o análisis de microarrays, por ejemplo, utilizando un microarray U133-A (Affymetrix). En otra realización específica, dichas células aisladas de la placenta expresan dichos uno o más genes cuando se cultivan para un número de duplicaciones de la población, por ejemplo, en cualquier lugar desde aproximadamente 3 a aproximadamente 35 duplicaciones de la población, en un medio que comprende DMEM-LG (por ejemplo, de Gibco); 2% de suero de ternera fetal (por ejemplo, de Hyclone Labs.); 1x insulina transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovina (LA-BSA); dexametasona 10^{-9} M (por ejemplo, de Sigma); ácido ascórbico 2-fosfato 10^{-4} M (por ejemplo, de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems). En otra realización específica, el gen aislado de la placenta de células específicas o aisladas de cordón umbilical específico de célula es CD200.

Secuencias específicas para estos genes se pueden encontrar en GenBank en los números de acceso 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 (IL1A), BT019749 (IL-6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NM_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM_014476 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160 o BC065328 (SLC 12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN), y BC005001 (ZC3H12A) a partir de marzo de 2008.

En ciertas realizaciones específicas, dichas células placentarias aisladas expresan cada uno de 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 detectable mayor que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, cuando se cultivan las células en condiciones equivalentes.

En realizaciones específicas, las células de la placenta expresan CD200 y ARTS1 (regulador de la aminopeptidasa del factor de necrosis tumoral tipo 1); ARTS-1 y LRAP (arginina aminopeptidasa derivada de leucocitos); IL6 (interleucina-6) y TGFB2 (factor de crecimiento transformante, beta 2); IL6 y KRT18 (queratina 18); IER3 (respuesta temprana inmediata 3), MEST (homólogo de transcripción específico de mesodermo) y TGFB2; CD200 y IER3; CD200 y IL6; CD200 y KRT18; CD200 y LRAP; CD200 y MEST; CD200 y NFE2L3 (factor nuclear (derivado de eritroide 2)-tipo 3); o CD200 y TGFB2 a un nivel detectable mayor que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC) en el que dichas células madre mesenquimales derivadas de médula ósea han sido objeto de una serie de pasajes en cultivo equivalente a la cantidad de pasajes que dichas células placentarias aisladas han sido sometidos. En otras realizaciones específicas, las células de la placenta expresan ARTS-1, CD200, IL6 y LRAP; ARTS-1, IL6, TGFB2, IER3, KRT18 y MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, y TGFB2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, y TGFB2; o IER3, MEST y TGFB2 a un nivel detectable mayor que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea BM-MSC, en el que dichas células madre mesenquimales derivadas de médula ósea han sufrido un número de pasajes en cultivo equivalente a la cantidad de pasajes que dichas células placentarias aisladas han sido sometidos.

La expresión de los genes anteriormente mencionados puede evaluarse por técnicas estándar. Por ejemplo, las sondas basadas en la secuencia del gen(es) se pueden seleccionar individualmente y construirse por técnicas convencionales. La expresión de los genes se puede evaluar, por ejemplo, en una micromatriz que comprende sondas para uno o más de los genes, por ejemplo, un array 2.0 U133A GeneChip® Human Genome de Affymetrix, o un GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 de Affymetrix (Santa Clara, California). La expresión de estos genes se puede evaluar incluso si la secuencia para un número particular de acceso de GenBank se modifica porque las sondas específicas para la secuencia modificada fácilmente se pueden generar utilizando técnicas estándar bien conocidas.

El nivel de expresión de estos genes puede utilizarse para confirmar la identidad de una población de células placentarias aisladas, para identificar una población de células como que comprende al menos una pluralidad de células placentarias aisladas, o similares. Las poblaciones de células placentarias aisladas, cuya identidad se confirma, puede ser clonal, por ejemplo, las poblaciones de células placentarias aisladas expandidas de una única célula aislada de placenta, o una población mixta de células madre, por ejemplo, una población de células que comprende únicamente células aisladas de la placenta que se expanden a partir de múltiples células placentarias aisladas, o una población de células que comprende células de la placenta aisladas, como se describe en el presente documento, y al menos otro tipo de célula.

El nivel de expresión de estos genes se puede utilizar para seleccionar poblaciones de células de la placenta aisladas. Por ejemplo, se puede seleccionar una población de células, por ejemplo, células expandidas clonalmente, si la expresión de uno o más de los genes mencionados anteriormente es significativamente mayor en una muestra de la población de células que en una población equivalente de las células madre mesenquimales. Tal selección puede ser de una población a partir de una pluralidad de poblaciones de células placentarias aisladas, a partir de una pluralidad de poblaciones de células, cuya identidad no se conoce, etc.

Las células placentarias aisladas pueden ser seleccionadas sobre la base del nivel de expresión de uno o más de dichos genes en comparación con el nivel de expresión en dicho uno o más genes en, por ejemplo, un control de células madre mesenquimatosas, por ejemplo, el nivel de expresión en dicho uno o más genes en un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. En una realización, el nivel de expresión de dicho uno o más genes en una muestra que comprende un número equivalente de células madre mesenquimatosas se utiliza como control. En otra realización, el control, para células placentarias aisladas probadas bajo ciertas condiciones, es un valor numérico que representa el nivel de expresión de dicho uno o más genes en las células madre mesenquimales en dichas condiciones.

En ciertas realizaciones, las células de la placenta (por ejemplo, PDAC) útiles en los métodos proporcionados en este documento, no expresan CD34, como se detecta por inmunolocalización, después de la exposición a de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En una realización específica, dichas células adherentes de la placenta son adherentes al plástico del cultivo de tejidos. En otra realización específica, dicha población de células induce a las células endoteliales para formar brotes o estructuras similares a tubos cuando se cultivan en presencia de un factor angiogénico como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), por ejemplo, en un sustrato tal como MATRIGEL™.

En otro aspecto, los PDAC proporcionados en este documento, una población de células, por ejemplo, una población de PDAC, o una población de células en la que al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las células en dicha población aislada de células son PDAC, secretan uno o más, o todos, de VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, o galectina-1, por ejemplo, en un medio de cultivo en el que la célula, o las células, se cultivan. En otra realización, los PDAC expresan niveles de CD202b, IL-8 y/o VEGF aumentados en condiciones de hipoxia (por ejemplo, menos de aproximadamente 5% de O₂) en comparación con condiciones de normoxia (por ejemplo, aproximadamente 20% o aproximadamente 21% de O₂).

En otra realización, cualquiera de los PDAC o poblaciones de células que comprenden las PDAC descritas en este documento puede causar la formación de brotes o estructuras similares a tubos en una población de células endoteliales en contacto con dichas células adherentes placentarias-derivadas. En una realización específica, las PDAC son co-cultivadas con células humanas endoteliales, que forman brotes o estructuras similares a tubos, o apoyan la formación de brotes de células endoteliales, por ejemplo, cuando se cultivan en presencia de proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno tipo I y IV, y/o factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), por ejemplo, en o sobre un sustrato tal como colágeno de placenta o MATRIGEL™ durante al menos 4 días. En otra realización, ninguna de las poblaciones de células que comprenden las células adherentes derivadas de la placenta, que se describen en el presente documento, secretan factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), o la interleucina-8 (IL-8) y por lo tanto pueden inducir a las células endoteliales humanas a formar brotes o estructuras en forma de tubo cuando se cultivan en presencia de proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno tipo I y IV por ejemplo, en o sobre un sustrato tal como el colágeno placentario o MATRIGEL™.

En otra realización, ninguna de las poblaciones anteriores de células que comprenden células adherentes placentarias derivadas (PDAC) segrega factores angiogénicos. En realizaciones específicas, la población de células secreta el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), y/o la interleucina-8 (IL-8). En otras realizaciones específicas, la población de células que comprende PDAC segrega uno o más factores angiogénicos y de ese modo induce a las células endoteliales humanas a migrar en un ensayo de curación de heridas in vitro. En otras realizaciones específicas, la población de células que comprende células

adherentes derivadas de la placenta induce la maduración, la diferenciación o la proliferación de células endoteliales humanas, progenitoras endoteliales, miocitos o mioblastos.

Las células placentarias aisladas descritas en este documento muestran las características anteriores (por ejemplo, las combinaciones de marcadores de superficie celular y/o perfiles de expresión génica) en cultivo primario, o durante la proliferación en medio que comprende, por ejemplo, DMEM-LG (Gibco), 2% de suero de ternera fetal (FCS) (Hyclone Laboratories), 1x insulina-transferrina-selenio (ITS), 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovina (LA-BSA), dexametasona 10^{-9} M (Sigma), ácido ascórbico 2- fosfato 10^{-9} 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 penicilina 100 U/estreptomicina 1000U.

- 10 En ciertas realizaciones de cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento, las células son humanas. En ciertas realizaciones de cualquiera de las células de la placenta descritas en este documento, las características de los marcadores celulares o características de expresión de genes son marcadores humanos o genes humanos.

- 15 En otra realización específica de dichas células placentarias aisladas o poblaciones de células que comprenden las células de la placenta aisladas, dichas células o población se han ampliado, por ejemplo, se han pasado al menos, aproximadamente, o no más de, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 veces, o más, o proliferaron por lo menos, sobre, o no más de, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 duplicaciones de población. En otra realización específica de dichas células placentarias aisladas o poblaciones de células que comprenden las células de la placenta aisladas, dichas células o población son aisladas primariamente. En otra realización específica de las células aisladas de la placenta, o poblaciones de células que comprenden células placentarias aisladas, que se dan a conocer en el presente documento, dichas células de la placenta aisladas son de origen fetal (es decir, tienen el genotipo fetal).

- 25 En ciertas realizaciones, dichas células placentarias aisladas no se diferencian durante el cultivo en el medio de crecimiento, es decir, medio formulado para promover la proliferación, por ejemplo, durante la proliferación en medio de crecimiento. En otra realización específica, dichas células aisladas de la placenta no requieren una capa de alimentación con el fin de proliferar. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas no se diferencian en cultivo en ausencia de una capa de alimentación, únicamente a causa de la falta de una capa de células de alimentación.

- 30 En otra realización, las células útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son células de la placenta aisladas, en las que una pluralidad de dichas células placentarias aisladas son positivas para aldehído deshidrogenasa (ALDH), tal como se evaluó mediante un ensayo de actividad de la aldehído deshidrogenasa. Tales ensayos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bostian y Betts, Biochem. J, 173, 787, (1978)). En una realización específica, dicho ensayo ALDH utiliza ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregon) como un
35 marcador de la actividad de la aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, dicha pluralidad es de entre aproximadamente 3% y aproximadamente 25% de las células en dicha población de células. En otra realización, se proporciona en este documento una población de células aisladas del cordón umbilical, por ejemplo, células del cordón umbilical aisladas multipotentes, en las que una pluralidad de dichas células del cordón umbilical aisladas son positivos para la aldehído deshidrogenasa, tal como se evaluó por un ensayo de actividad de la aldehído
40 deshidrogenasa que utiliza ALDEFLUOR® como un indicador de la actividad de la aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, dicha pluralidad está entre aproximadamente 3% y aproximadamente 25% de las células en dicha población de células. En otra realización, dicha población de células de la placenta aisladas o células del cordón umbilical aisladas muestra al menos tres veces, o al menos cinco veces, la actividad de ALDH más alta que una población de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea que tienen aproximadamente el mismo
45 número de células y se cultivaron en las mismas condiciones.

- En ciertas realizaciones de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células placentarias aisladas descritos en este documento, las células de la placenta en dicha población de células están sustancialmente libres de células que tienen un genotipo de la madre; por ejemplo, al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células de la placenta en dicha población tiene un
50 genotipo fetal. En ciertas otras realizaciones de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células placentarias aisladas descritas en este documento, las poblaciones de células que comprenden dichas células placentarias están sustancialmente libres de células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicha población tienen un genotipo fetal.

- 55 En una realización específica de cualquiera de las células placentarias aisladas anteriores o poblaciones de células de las células placentarias aisladas, 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 células anteriores de la placenta o poblaciones de células, las células, o células en la población de células, no son de origen materno.

Las células aisladas de la placenta, o poblaciones de células placentarias aisladas, que llevan cualquiera de las combinaciones anteriores de los marcadores, se pueden combinar en cualquier proporción. Cualquiera de dos o más de las poblaciones de células placentarias aisladas anteriores se pueden combinar para formar una población de células de la placenta aisladas. Por ejemplo, una población de células de la placenta aisladas puede comprender una primera población de células placentarias aisladas definida por una de las combinaciones de marcadores descritos anteriormente, y una segunda población de células placentarias aisladas definido por otra de las combinaciones de los marcadores descritos anteriormente, en el que dicha primera y segunda poblaciones se combinan en una relación 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 la misma manera, se pueden combinar cualquier de tres, cuatro, cinco o más de las células aisladas de la placenta descritas anteriormente o poblaciones de células aisladas de la placenta.

Las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden obtener, por ejemplo, por la alteración del tejido placentario, con o sin digestión enzimática (véase la Sección 5.3.3) o perfusión (véase la Sección 5.3.4). Por ejemplo, las poblaciones de células de la placenta aisladas pueden ser producidas de acuerdo a un método que comprende perfundir una placenta de mamífero que se ha drenado de sangre del cordón umbilical y perfundir 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 de la placenta que comprende células de la placenta aisladas; y aislar una pluralidad de dichas células de la placenta aisladas de dicha población de células. En una realización específica, la solución de perfusión se pasa a través tanto de la vena umbilical como de las arterias umbilicales y se recoge después de que emana de la placenta. En otra realización específica, la solución de perfusión se pasa a través de la vena umbilical y se recoge a partir de las arterias umbilicales, o se pasa a través de las arterias umbilicales y se recoge de la vena umbilical.

En diversas realizaciones, las células placentarias aisladas, contenidas dentro de una población de células obtenidas a partir de la perfusión de la placenta, son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% de dicha población de células de la placenta. En otra realización específica, las células placentarias aisladas recogidas por perfusión comprenden células fetales y maternas. En otra realización específica, las células placentarias aisladas recogidas por perfusión son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% de células fetales.

En otra realización específica, se proporciona en este documento una composición que comprende una población de células placentarias aisladas, como se describe en el presente documento, recogida por perfusión, en el que dicha composición comprende al menos una porción de la solución de perfusión utilizada para recoger las células de la placenta aisladas.

Las poblaciones aisladas de las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria se pueden producir mediante la digestión del tejido de la placenta con una enzima que altere el tejido para obtener una población de células de la placenta, que comprende las células, y el aislamiento, o sustancialmente el aislamiento de una pluralidad de las células de la placenta del resto de dicho células de la placenta. La totalidad o cualquier parte de la placenta pueden ser digeridas para obtener las células de la placenta aisladas descritas en el presente documento. En realizaciones específicas, por ejemplo, dicho tejido de la placenta puede ser toda una placenta, una membrana amniótica, el corion, una combinación de amnios y el corion, o una combinación de cualquiera de los anteriores. En otra realización específica, la enzima que altera el tejido es tripsina o colagenasa. En diversas realizaciones, las células placentarias aisladas, contenidas dentro de una población de células obtenidas 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 de la placenta.

Las poblaciones aisladas de células de la placenta descritas anteriormente, y las poblaciones de células placentarias aisladas en general, pueden comprender de aproximadamente, por lo menos, o no más de, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más de las células de la placenta aisladas. Las poblaciones de células placentarias aisladas útiles en los métodos de tratamiento descritos en este documento comprenden al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% , o 99% de células viables aisladas de la placenta, por ejemplo, según se determina mediante, por ejemplo, la exclusión de azul de tripano.

5.2.3 Crecimiento en cultivo

El crecimiento de las células placentarias aisladas descrito en este documento en la Sección 5.4.2, como para cualquier célula de mamífero, depende en parte el medio particular seleccionado para el crecimiento. En condiciones óptimas, las células placentarias aisladas típicamente se duplican en número en aproximadamente 1 día. Durante el cultivo, las células placentarias aisladas descritas en este documento se adhieren a un sustrato en cultivo, por ejemplo, la superficie de un recipiente de cultivo de tejidos (por ejemplo, placa de cultivo de tejidos de plástico, plástico recubierto de fibronectina, y similares) y forman una monocapa.

Las poblaciones de células de la placenta que comprenden las células placentarias aisladas descritas en este documento, cuando se cultivan en condiciones apropiadas, pueden formar cuerpos tipo embrionarios, es decir, agrupaciones tridimensionales de células crecen encima de la capa de células adherentes. Las células dentro de los cuerpos tipo embrionarios pueden expresar marcadores asociados con células madre muy tempranas, por ejemplo, OCT-4, Nanog, SSEA3 y SSEA4. Las células dentro de los cuerpos tipo embrionarios no son típicamente adherentes al sustrato de cultivo, al igual que las células placentarias aisladas descritas en este documento, pero tienden a permanecer unidas a las células adherentes durante el cultivo. Las células del cuerpo tipo embrionario dependen de las células de la placenta aisladas adherentes para su viabilidad, ya que los cuerpos tipo embrionarios no se forman en ausencia de las células de la placenta aisladas adherentes. Así, las células de la placenta aisladas adherentes facilitan el crecimiento de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta que comprenden las células de la placenta aisladas adherentes. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que las células de los cuerpos tipo embrionarios que crecen en las células de la placenta aisladas adherentes tanto como las células madre embrionarias crecen en una capa de alimentación de células.

5.3 Métodos de obtención de células placentarias aisladas

5.3.1 Composición de recolección de células madre

Se proporcionan además en este documento métodos de recogida y aislamiento de células de la placenta, por ejemplo, las células de la placenta aisladas descritas en la Sección 5.2.2, más arriba. Generalmente, tales células se obtienen a partir de una placenta de mamíferos usando una solución fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una composición de recogida de células. Una composición de recogida de células ejemplar se describe en detalle en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2007/0190042 relacionada, titulada "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs".

La composición de recogida de células puede comprender cualquier solución fisiológicamente aceptable adecuada para la recogida y/o cultivo de células, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en este documento, por ejemplo, una solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, solución de Krebs, solución modificada de Krebs, solución de Eagle, NaCl al 0,9%, etc.), un medio de cultivo (por ejemplo, DMEM, H.DMEM, etc.), y similares.

La composición de recogida de células puede comprender uno o más componentes que tienden a preservar las células placentarias aisladas, es decir, evitan la muerte de las células placentarias aisladas, o retrasan la muerte de las células placentarias aisladas, reducen el número de células placentarias aisladas en una población de células que mueren, o similares, desde el momento de la recolección al momento del cultivo. Tales 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 antihipertensivo, péptido natriurético atrial (ANP), adrenocorticotropina, hormona liberadora de corticotropina, nitroprusiato de sodio, hidralazina, adenosina trifosfato, adenosina, indometacina o sulfato de magnesio, un inhibidor de la fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de la necrosis (por ejemplo, 2-(1H-Indol-3-il)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina, o clonazepam); un inhibidor de TNF- α ; y/o un perfluorocarbono de transporte de oxígeno (por ejemplo, bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

La composición de recogida de células puede comprender una o más enzimas que degradan el tejido, por ejemplo, una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una RNasa, o una DNasa, o similares. Tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, colagenasas (por ejemplo, colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASE, hialuronidasa, y similares.

La composición de recogida de células puede comprender una cantidad bacteriocidicamente o bacteriostáticamente efectiva de un antibiótico. En ciertas realizaciones no limitantes, el antibiótico es un macrólido (por ejemplo, tobramicina), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxil), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (por ejemplo, penicilina V) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, un estreptomicina, etc. En una realización particular, el antibiótico es activo contra las bacterias Gram (+) y/o Gram (-), por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y similares. En una realización, el antibiótico es gentamicina, por ejemplo, de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,01 (p/v) en medio de cultivo.

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

presente en de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 25 μM); nitroglicerina (por ejemplo, de aproximadamente 0,05 g/L a aproximadamente 0,2 g/L); un anticoagulante, en una realización, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de la sangre residual (por ejemplo, heparina o hirudina presente en una concentración de aproximadamente 1.000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (por ejemplo, amilorida, etilo isopropilo amilorida, hexametileno amilorida, dimetilo amilorida o isobutilo amilorida presentes en de aproximadamente 1,0 μM a aproximadamente 5 μM).

5.3.2 Recolección y manipulación de la placenta

En general, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento. En una realización preferida, la placenta se recupera de un paciente después de su consentimiento informado y después de que se tome una historia clínica completa del paciente y se asocie con la placenta. Preferiblemente, la historia médica continúa después del parto. Un historial médico de este tipo puede ser utilizado para coordinar el uso posterior de la placenta o las células placentarias aisladas cosechadas a partir de la misma. Por ejemplo, las células placentarias humanas aisladas se pueden utilizar, a la luz de la historia clínica, para una medicina personalizada del bebé asociado a la placenta, o para los padres, hermanos u otros parientes del bebé.

Antes de la recuperación de las células placentarias aisladas, la sangre del cordón umbilical y la sangre de la placenta se eliminan preferentemente. En ciertas realizaciones, después de la expulsión, la sangre del cordón umbilical en la placenta se recupera. La placenta se puede someter a un proceso de recuperación de sangre del cordón convencional. Típicamente se utiliza una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para desangrar la placenta (véase, por ejemplo, Anderson, patente de EE.UU. n° 5.372.581; Hessel et al., patente de EE.UU. n° 5.415.665). La aguja o cánula se colocan generalmente en la vena umbilical y se puede dar masajes a la placenta suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón de la placenta. Esa recuperación de la sangre del cordón umbilical se puede realizar en el comercio, por ejemplo, LifeBank EE.UU., Cedar Knolls, N. J. Preferiblemente, la placenta es drenada por gravedad sin manipulación adicional con el fin de minimizar la alteración del tejido durante la recuperación de sangre del cordón.

Típicamente, una placenta se transporta desde la sala de partos a otra ubicación, por ejemplo, un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y la recogida de las células madre mediante, por ejemplo, la perfusión o la disociación del tejido. La placenta se transporta preferiblemente en un dispositivo de transporte estéril, aislado térmicamente (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28°C), por ejemplo, mediante la colocación de la placenta con el cordón umbilical con pinzado proximal, en una bolsa de plástico con cierre con cremallera estéril, que se coloca luego en un recipiente aislado. En otra realización, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre del cordón sustancialmente tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 7.147.626 pendiente. Preferiblemente, la placenta se entrega al laboratorio de cuatro a veinticuatro horas después del parto. En ciertas realizaciones, el cordón umbilical proximal se pinza, preferiblemente entre 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco de la placenta antes de la recuperación de la sangre del cordón. En otras realizaciones, el cordón umbilical proximal se pinza después de la recuperación de la sangre del cordón, pero antes del procesamiento adicional de la placenta.

La placenta, antes de la recogida de las células, puede almacenarse en condiciones estériles y tanto a temperatura ambiente como a una temperatura de 5°C a 25°C. La placenta puede conservarse durante un período de cuatro a veinticuatro horas hasta cuarenta y ocho horas, o más de cuarenta y ocho horas, antes de la perfusión de la placenta para eliminar la sangre del cordón residual. En una realización, la placenta se recoge de entre aproximadamente cero horas a aproximadamente dos horas después de la expulsión. La placenta se almacena preferiblemente en una solución anticoagulante a una temperatura de 5°C a 25°C. Soluciones anticoagulantes adecuadas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, una solución de heparina o warfarina sódica se puede utilizar. En una realización preferida, la solución de anticoagulante comprende una solución de heparina (por ejemplo, 1% p/p en solución 1:1000). La placenta exanguinada se almacena preferiblemente por no más de 36 horas antes de recoger las células de la placenta.

La placenta de mamífero o una parte de la misma, una vez recogida y preparada generalmente como anteriormente, puede ser tratada de cualquier manera conocida en la técnica, por ejemplo, puede ser perfundida o alterada, por ejemplo, digerida con una o más enzimas que alteren el tejido, para obtener células aisladas de la placenta.

5.3.3 Alteración física y digestión enzimática del tejido placentario

En una realización, las células madre se obtienen de una placenta de mamíferos por la alteración física de parte de todo el órgano. Por ejemplo, la placenta, o una porción de la misma, pueden ser, por ejemplo, aplastadas, cortadas, picadas, cortadas en dados, troceadas, maceradas o similares. El tejido entonces puede cultivarse para obtener una población de células de la placenta aisladas. Típicamente, el tejido de la placenta se altera usando, por ejemplo, medio de cultivo, una solución salina, o una composición de recolección de células madre (véase la Sección 5.5.1 y más abajo).

La placenta puede ser diseccionada en componentes antes de la alteración física y/o digestión enzimática y la recuperación de las células madre. Las células de la placenta aisladas pueden obtenerse a partir de la totalidad o

- una porción de la membrana amniótica, corion, cordón umbilical, cotiledones placentarios, o cualquier combinación de los mismos, incluso de toda una placenta. Preferiblemente, las células de la placenta aisladas son obtenidas a partir del tejido que comprende los amnios y el corion de la placenta. Típicamente, las células de la placenta aisladas se pueden obtener por la ruptura de un pequeño bloque del tejido de la placenta, por ejemplo, un bloque de tejido de la placenta 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 en volumen. Cualquier método de ruptura física se puede utilizar, siempre que el método de ruptura deje una pluralidad, más preferiblemente una mayoría, y más preferiblemente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicho órgano viables, tal como se determina mediante, por ejemplo, exclusión de azul de tripano.
- Las células de la placenta adherentes aisladas, en general, se pueden obtener de una placenta, o parte de ésta, en cualquier momento dentro de los tres primeros días después de la expulsión, pero preferiblemente entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 18 horas después de la expulsión.
- En una realización específica, el tejido roto se cultiva en medio de cultivo tisular adecuado para la proliferación de las células placentarias aisladas (véase, por ejemplo, la Sección 5.6, más abajo, que describe el cultivo de células de la placenta, por ejemplo, PDAC).
- En otra realización específica, las células placentarias aisladas se recogen por ruptura física del tejido de la placenta, en el que la ruptura física incluye la digestión enzimática, que se puede lograr mediante el uso de una o más enzimas que digieren el tejido. La placenta, o una porción de la misma, también puede ser desmenuzada físicamente y digerida con una o más enzimas, y el material resultante puede ser sumergido entonces, o mezclado en una composición de recogida de células.
- Una composición de recogida de células preferida comprende una o más enzima(s) de alteración del tejido. Las enzimas que se pueden utilizar para la alteración del tejido de placenta incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina, collagenasa, dispasa o elastasa. Las serina proteasas pueden ser inhibidas por la alfa 2 microglobulina en suero y, por tanto, el medio utilizado para la digestión está por lo general libre de suero. EDTA y DNasa se utilizan comúnmente en procedimientos de digestión de enzimas para aumentar la eficiencia de la recuperación celular. El digestato se diluye preferentemente a fin de evitar el atrapamiento de las células dentro del digesto viscoso.
- Cualquier combinación de enzimas de digestión de tejido se puede utilizar. Las concentraciones típicas para la digestión utilizando tripsina incluyen de 0,1% a aproximadamente 2% de tripsina, por ejemplo, aproximadamente 0,25% tripsina. Se pueden utilizar proteasas en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o se pueden utilizar de forma secuencial con el fin de liberar las células de la placenta, por ejemplo, células madre de la placenta y células multipotentes placentarias. Por ejemplo, en una realización, una placenta, o parte de la misma, se digiere primero con una cantidad apropiada de la collagenasa I de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 mg/ml durante, por ejemplo, 30 minutos, seguido por la digestión con tripsina, a una concentración de aproximadamente 0,25%, durante, por ejemplo, 10 minutos, a 37°C. Las serina proteasas se utilizan preferiblemente después del uso de otras enzimas.
- En otra realización, el tejido puede además ser alterado por la adición de un quelante, por ejemplo, etilenglicol bis (2-aminoetil éter) -N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la composición de recolección de células madre que comprende las células madre, o en una solución en la que se altere el tejido y/o digiera antes del aislamiento de las células madre con la composición de recolección de células madre.
- Después de la digestión, la digestión se lava, por ejemplo, tres veces con medio de cultivo, y las células lavadas se siembran en frascos de cultivo. Las células se aíslan entonces mediante adherencia diferencial, y se caracterizan, por ejemplo, por viabilidad, marcadores de superficie celular, diferenciación, y similares.
- Se apreciará que, cuando toda una placenta, o parte de una placenta que comprende tanto las células fetales como maternas (por ejemplo, cuando la porción de la placenta comprende el corion o los cotiledones), las células de la placenta aisladas pueden comprender una mezcla de células derivadas de la placenta tanto de fuentes fetales como de maternas. Cuando una parte de la placenta que no comprende, o comprende un número insignificante de las células maternas (por ejemplo, amnios), las células placentarias aisladas de los mismos comprenderán células de la placenta casi exclusivamente fetales (es decir, células de la placenta que tienen el genotipo del feto).
- Las células de la placenta, por ejemplo, las células de la placenta descritas en la Sección 5.2.2, más arriba, pueden ser aisladas a partir de tejido de la placenta alterado por tripsinización diferencial (véase la sección 5.3.5, más adelante) seguido de cultivo en uno o más nuevos recipientes de cultivo en medio de proliferación fresco, opcionalmente seguido de una segunda etapa de tripsinización diferencial.
- #### 5.3.4 Perfusión placentaria
- Las células de la placenta, por ejemplo, las células de la placenta descritas en la Sección 5.2.2, más arriba, pueden también ser obtenidas por perfusión de la placenta de mamíferos. Los métodos de perfusión de la placenta de

mamíferos para obtener células de la placenta se describen, por ejemplo, en Hariri, Patentes de Estados Unidos Nos. 7.045.148 y 7.255.729, en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nos. 2007/0275362 y 2007/0190042.

Las células de la placenta pueden ser recogidas por perfusión, por ejemplo, a través de la vasculatura de la placenta, usando, por ejemplo, una composición de recogida de células como una solución de perfusión. En una realización, una placenta de mamíferos es perfundida por el paso de la solución de perfusión a través de una o ambas arteria umbilical y vena umbilical. El flujo de la solución de perfusión a través de la placenta puede realizarse utilizando, por ejemplo, el flujo por gravedad en la placenta. Preferiblemente, la solución de perfusión es forzada a través de la placenta mediante una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica. La vena umbilical puede ser, por ejemplo, canulada con una cánula, por ejemplo, un TEFLON® o cánula de plástico, que se conecta a un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión.

En la preparación para la perfusión, se orienta preferiblemente la placenta (por ejemplo, en suspensión) de una manera tal que la arteria umbilical y la vena umbilical se encuentren en el punto más alto de la placenta. La placenta puede ser perfundida por el paso de un fluido de perfusión a través de la vasculatura de la placenta y el tejido circundante. La placenta también puede ser perfundida por el paso de un fluido de perfusión en la vena umbilical y la recogida de las arterias umbilicales, o el paso de un fluido de perfusión en las arterias umbilicales y la recolección de la vena umbilical.

En una realización, por ejemplo, la arteria umbilical y la vena umbilical se conectan de forma simultánea, por ejemplo, a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un depósito de la solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa dentro de la vena umbilical y de la arteria. La solución de perfusión exuda desde y/o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos en los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un recipiente abierto adecuado de la superficie de la placenta que está unido al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también se puede introducir a través de la apertura del cordón umbilical y dejarse fluir o filtrarse hacia afuera de las aperturas en la pared de la placenta que hace interfaz con la pared del útero materno. Las células de la placenta que son recogidas por este método, que se puede denominar como un método de "cubeta", son típicamente una mezcla de células fetales y maternas.

En otra realización, la solución de perfusión se pasa a través de las venas umbilicales y de la arteria umbilical, o se hace pasar a través de la arteria umbilical y se recoge de las venas umbilicales. Las células de la placenta recogidas por este método, al que se puede hacer referencia como un método de "circuito cerrado", son típicamente casi exclusivamente fetales.

Se apreciará que la perfusión utilizando el método de cubeta, es decir, por el que se recoge el líquido de perfusión 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 por este método pueden comprender una población mixta de células de la placenta, por ejemplo, las células madre de la placenta o células multipotentes de la placenta, tanto de origen fetal como materno. En contraste, la perfusión únicamente a través de la vasculatura de la placenta en el método del circuito cerrado, con el cual se hace pasar el fluido de perfusión a través de uno o dos vasos de la placenta y se recoge únicamente a través del recipiente(s) restante, los resultados de la colección de una población de células de la placenta son casi exclusivamente de origen fetal.

El método de perfusión de circuito cerrado puede, en una realización, realizarse como sigue. Se obtiene una placenta después del parto dentro de aproximadamente 48 horas después del nacimiento. El cordón umbilical se pinza y se corta por encima de la pinza. El cordón umbilical puede ser descartado, o puede ser procesado 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 ser retenida durante la perfusión, o se puede separar del corion, por ejemplo, usando una disección roma con los dedos. Si la membrana amniótica se separa del corion antes de la perfusión, que puede ser, por ejemplo, desechada, o procesada, por ejemplo, para obtener células madre por digestión enzimática, o para producir, por ejemplo, un biomaterial de membrana amniótica, por ejemplo, el biomaterial se describe en la publicación de solicitud de Estados Unidos N° 2004/0048796. Después de limpiar la placenta de todos los coágulos sanguíneos visibles y la 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 exponer una sección transversal del cordón. Los vasos se identifican, y se abren, por ejemplo, haciendo avanzar una pinza cocodrilo cerrada a través del extremo del corte de cada vaso. El aparato, por ejemplo, un tubo de plástico conectado a un dispositivo de perfusión o bomba peristáltica, se inserta entonces en cada una de las arterias de la placenta. La bomba puede ser cualquier bomba adecuada para el propósito, por ejemplo, una bomba peristáltica. Los tubos de plástico, conectados a un depósito de recogida estéril, por ejemplo, una bolsa de sangre, tal como una bolsa de recogida de 250 ml, se insertan entonces en la vena de la placenta. Alternativamente, el tubo conectado a la bomba se inserta en la vena de la placenta, y los tubos a un depósito(s) de recogida se insertan en una o ambas de las arterias de la placenta. La placenta es entonces perfundida con un volumen de solución de perfusión, por ejemplo, aproximadamente 750 ml de solución de perfusión. Las células en el líquido de perfusión se recogen a continuación, por ejemplo, por centrifugación. En ciertas realizaciones, la placenta se perfunde con la solución de perfusión, por ejemplo, de 100 a 300 ml de solución de perfusión, para eliminar la sangre residual antes de la perfusión para recoger células de la placenta, por ejemplo, células madre de la placenta y/o células multipotentes

placentarias. En otra realización, la placenta no se perfunde con la solución de perfusión para eliminar la sangre residual antes de la perfusión para recoger las células de la placenta.

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

- 5 La primera recolección de fluido de perfusión a partir de una placenta de mamíferos durante el proceso de la extracción de sangre es por lo general de color con los glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón umbilical y/o sangre de la placenta. El fluido de perfusión se vuelve más incoloro según procede la perfusión y las células de sangre de cordón residuales se lavan fuera de la placenta. Generalmente de 30 a 100 ml (mililitros) de fluido de perfusión es adecuado para extraer la sangre inicialmente de la placenta, pero más o menos fluido de perfusión se puede utilizar en función de los resultados observados.

- 10 El volumen del líquido de perfusión usado para aislar células de la placenta puede variar en función del número de células que se recoge, el tamaño de la placenta, el número de recolecciones que se hacen de una sola placenta, etc. En varias realizaciones, el volumen del 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 de 750 ml a 2000 ml. Por lo general, la placenta es perfundida con 700-800 ml de líquido de perfusión tras la extracción de sangre.

- 15 La placenta se puede perfundir una pluralidad de veces durante el curso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se perfunde una pluralidad de veces, puede mantenerse o cultivarse en condiciones asépticas en un contenedor u otro recipiente adecuado, y se perfunde con la composición de recogida de células, o una solución de perfusión estándar (por ejemplo, una solución salina normal, tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (por ejemplo, heparina, warfarina de sodio, cumarina, bishidroxycumarina), y/o con o sin un agente antimicrobiano (por ejemplo, β -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomina (por ejemplo, a 40-100 μ g/ml), penicilina (por ejemplo, a 40 U/ml), anfotericina B (por ejemplo, a 0,5 μ g/ml). En una realización, una placenta aislada se mantiene o se cultiva durante un período de tiempo sin recoger el perfundido, de manera que la placenta se mantiene o se 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 ó 24 horas, o 2 ó 3 o más días antes de la perfusión y la recolección del líquido de perfusión. La placenta perfundida se puede mantener por uno o más tiempo(s), 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 ser perfundida una segunda vez con, por ejemplo, de 700 a 800 ml de fluido de perfusión. La placenta puede ser perfundida 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 horas. En una realización preferida, la perfusión de la placenta y la recogida de la solución de perfusión, por ejemplo, la composición de recogida de células, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos en diferentes puntos temporales se pueden seguir procesando de forma individual para recuperar las poblaciones dependientes del tiempo de las células, por ejemplo, las células madre. Los perfundidos desde diferentes puntos de tiempo también pueden ser combinados. En una realización preferida, las células de la placenta se recogen a la vez o en veces entre aproximadamente 8 horas y 35 aproximadamente 18 horas después de la expulsión.

- La perfusión da como resultado preferiblemente la recolección de células significativamente más placentarias que el número que se puede obtener a partir de una placenta de mamíferos no perfundida con dicha solución, y que no se trata de otra manera para obtener células de la placenta (por ejemplo, por la alteración del tejido, por ejemplo, la digestión enzimática). En este contexto, "significativamente más" significa al menos 10% más. La perfusión produce 40 células significativamente más placentarias que, por ejemplo, el número de células de la placenta aislable a partir del medio de cultivo en el que una placenta, o parte de la misma, se ha cultivado.

- Las células de la placenta pueden ser aisladas de placenta por perfusión con una solución que comprenda una o más proteasas u otras enzimas disruptivas de tejido. En una realización específica, una placenta o porción de la misma (por ejemplo, membrana amniótica, amnios y el corion, lóbulo de la placenta o cotiledón, cordón umbilical, o combinación de cualquiera de los anteriores) se lleva a 25-37°C, y se incuba con una o más enzimas disruptivas de 45 tejido en 200 ml de un medio de cultivo durante 30 minutos. Las células de la perfusión se recogen, se ponen a 4°C, y se lavan con una mezcla fría de inhibidor que comprende EDTA 5 mM, ditiotretitol 2 mM y beta-mercaptoetanol 2 mM. Las células de la placenta se lavan después de varios minutos con una composición de recolección de células madre fría (por ejemplo, 4°C).

- 50 5.3.5 Aislamiento, clasificación y caracterización de las células de la placenta

- Las células placentarias aisladas, por ejemplo, las células descritas en la Sección 5.2.2, más arriba, ya sean obtenidas mediante perfusión como por ruptura física, por ejemplo, por digestión enzimática, pueden inicialmente purificarse a partir de (es decir, ser aisladas de) otras células por centrifugación en gradiente de Ficoll. Tal centrifugación puede seguir cualquier protocolo estándar para la velocidad de centrifugación, etc. En una realización, 55 por ejemplo, las células recogidas de la placenta se recuperan del perfundido por centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, lo que separa las células de, por ejemplo, la contaminación de los residuos y las plaquetas. En otra realización, el perfundido de la placenta se concentra a aproximadamente 200 ml, en capas suavemente sobre Ficoll y se centrifuga a aproximadamente 1100 x g durante 20 minutos a 22°C, y la capa de interfaz de baja densidad de células se recoge para su posterior procesamiento.

Los sedimentos celulares pueden resuspenderse en la composición de recolección de células madre fresca, o un medio adecuado para el mantenimiento de células, por ejemplo, el mantenimiento de células madre, por ejemplo, medio libre de suero IMDM que contiene 2 U/ml de heparina y 2 mM EDTA (GibcoBRL, NY). El total de la fracción de células mononucleares se puede aislar, por ejemplo, usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.

Las células placentarias obtenidas mediante perfusión o digestión pueden, por ejemplo, ser además, o al principio, aisladas por tripsinización diferencial usando, por ejemplo, una solución de tripsina al 0,05% con 0,2% de EDTA (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial es posible porque las células de la placenta, que son aisladas del tejido del cultivo de plástico adherente, por lo general se desprenden de las superficies de plástico a unos cinco minutos, mientras que otras poblaciones adherentes requieren típicamente más de 20 a 30 minutos de incubación. Las células de la placenta separadas pueden ser cosechadas después de la tripsinización y la neutralización de tripsina, utilizando, por ejemplo, solución neutralizante de tripsina (TNS, Cambrex). En una realización de aislamiento de células adherentes, alícuotas de, por ejemplo, aproximadamente $5 \cdot 10^6$ células se colocan en cada uno de varios matraces T-75, preferiblemente matraces T75 recubiertos de fibronectina. En tal realización, las células pueden ser cultivadas con Medio de Crecimiento disponible comercialmente de células madre mesenquimales (MSCGM) (Cambrex), y colocarse en una incubadora de cultivo de tejidos (37°C, 5% CO₂). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiran de los matraces mediante lavado con PBS. El PBS se reemplaza luego por MSCGM. Los matraces se examinan preferiblemente todos los días para determinar la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y la expansión de grupos de células fibroblastoides.

El número y tipo de células recogidas a partir de una placenta de mamíferos se pueden monitorizar, por ejemplo, midiendo los cambios en los marcadores de la morfología y de la superficie celular usando técnicas de detección de células estándar, tales como la citometría de flujo, clasificación de células, clasificación de células activadas por fluorescencia inmunocitoquímica (por ejemplo, tinción con anticuerpos específicos de tejido o específico de marcador de células) (FACS), por clasificación magnética de células activadas (MACS), mediante el examen de la morfología de las células usando luz o microscopía confocal, y/o midiendo los cambios en la expresión génica usando técnicas bien conocidas en la técnica, tal como la PCR y perfiles de expresión génica. Estas técnicas se pueden usar, también, para identificar las 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 es así, la célula es CD34⁺. 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 de una célula adulta, la célula es OCT-4. Los anticuerpos frente a marcadores de superficie celular (por ejemplo, marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de genes específicos de células madre, tales como OCT-4, son bien conocidos en la técnica.

Las células de la placenta, en particular las células que han sido aisladas por separación de Ficoll, adhesión diferencial, o una combinación de ambas, pueden ser clasificadas usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para las partículas de separación, incluyendo las células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151: 150-165). La excitación láser de restos 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 una realización, los anticuerpos o ligandos específicos del marcador de la superficie celular se marcan con marcadores fluorescentes distintos. Las células se procesan a través del clasificador de células, permitiendo la separación de las células en función de 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, las células de la placenta, por ejemplo, PDAC se clasifican sobre la base de la expresión de uno o más de los marcadores CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 y/o HLA-G. Esto se puede lograr en relación con los procedimientos para seleccionar tales células sobre la base de sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, la selección de adherencia al plástico del cultivo del tejido se puede realizar antes o después de la clasificación sobre la base de la expresión del marcador. En una realización, por ejemplo, las células se clasifican primero sobre la base de su expresión de CD34; las células CD34⁺ se conservan, y las células CD34⁻ que son, además, CD200⁺ y HLA-G⁻ se separan de todas las otras células CD34⁻. En otra realización, las células de la placenta se clasifican según su expresión de marcadores CD200 y/o HLA-G; por ejemplo, las células que presentan CD200 y que carecen de HLA-G se aíslan para su uso posterior. Las células que expresan, por ejemplo, CD200 y/o que carecen de, por ejemplo, HLA-G pueden, en una realización específica, ser clasificadas aún más en función de su expresión de CD73 y/o CD105, o epítomos reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o carecen de expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, en otra realización, las células placentarias se clasifican por la expresión, o la carencia de la misma, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y las células de la placenta que son CD200⁺, HLA-G⁻, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻ se aíslan de otras células de la placenta para su uso posterior.

En realizaciones específicas de cualquiera de las realizaciones anteriores de las células de la placenta clasificadas, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células en una población de células que quedan después de la

clasificación se dicen que son células placentarias aisladas. Las células de la placenta pueden clasificarse por uno o más de cualquiera de los marcadores descritos en la Sección 5.2.2, más arriba.

En una realización específica, por ejemplo, las células de la placenta que son (1) adherentes al plástico del cultivo de tejidos, y (2) CD10⁺, CD34⁻ y CD105⁺ son clasificadas de (es decir, aisladas de) otras células de la placenta. En otra realización específica, células placentarias que son (1) adherentes al plástico de cultivo de tejidos, y (2) CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ y CD200⁺ se clasifican (es decir, se aíslan) a partir de otras células de la placenta. En otra realización específica, las células placentarias que son (1) adherentes al plástico del cultivo de tejidos, y (2) CD10⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺ se clasifican (es decir, se aíslan) a partir de otras células de la placenta.

Con respecto a la detección basada en la secuencia de nucleótidos de células de la placenta, las secuencias para los marcadores enumerados en el presente documento están disponibles en bases de datos públicamente disponibles, tales como GenBank o EMBL.

Con respecto a la detección mediada por anticuerpos y la clasificación de células de la placenta, por ejemplo, células madre de la placenta o células multipotentes de la placenta, cualquier anticuerpo, específico para un marcador particular, se puede utilizar, en combinación con cualquier fluoróforo u otro marcador adecuado para la detección y clasificación de las células (por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia).

Las combinaciones de anticuerpos/fluoróforos frente a marcadores específicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) frente a HLA-G⁻ (disponible de Serotec, Raleigh, Carolina del Norte), CD10 (disponible de BD Immunocytometry Systems, San José, California), CD44 (disponible de BD Biosciences Pharmingen, San José, California), y el CD105 (disponible de R & D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota); anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina (PE) contra CD44, CD200, CD117 y CD 13 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina-Cy7 (PE Cy7) contra CD33 y CD10 (BD Biosciences Pharmingen); estreptavidina conjugada aloficocianina (APC) y anticuerpos monoclonales contra CD38 (BD Biosciences Pharmingen); y CD90 biotinilado (BD Biosciences Pharmingen). Otros anticuerpos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, CD133-APC (Miltyi), KDR-Biotina (CD309, Abeam), CytokeratinK-FITC (Sigma o Dako), HLA ABC-FITC (BD), HLA DR, DQ, DP-PE (BD), β-2-microglobulina-PE (BD), CD80-PE (BD) y CD86-APC (BD). Otras combinaciones de anticuerpo/marcadores que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, CD45-PerCP (Peridin proteína clorofila), CD44-PE; CD19-PE; CD10-F (fluoresceína); HLA-G-F y 7-amino-actinomicina-D (7-AAD); HLA-ABC-F; y similares. Esta lista no es exhaustiva, y otros anticuerpos a partir de otros proveedores también están disponibles comercialmente.

Las células placentarias aisladas proporcionadas en este documento pueden ensayarse para CD117 o CD133 usando, por ejemplo, estreptavidina conjugada a ficoeritrina-Cy5 (PE Cy5) y anticuerpos monoclonales conjugados con biotina contra CD117 o CD133; sin embargo, usando este sistema, las células pueden parecer ser positivas para CD117 o CD133, respectivamente, debido a la relativamente alta línea de fondo.

Las células de la placenta aisladas se pueden marcar con un anticuerpo para un solo marcador y se detectan y/clasifican. Las células de la placenta pueden marcarse también simultáneamente con múltiples anticuerpos contra diferentes marcadores.

En otra realización, las perlas magnéticas se pueden utilizar para separar las células. Las células pueden ser clasificadas usando una técnica de clasificación celular magnética activada (MACS), un método para la separación de partículas en función de su capacidad para unirse a perlas magnéticas (0,5-100 μm diámetro). Una variedad de modificaciones útiles se puede realizar en las microesferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de anticuerpos que reconocen específicamente una molécula de superficie celular particular o hapteno. Las perlas se mezclan entonces con las células para permitir la unión. Después las células se pasan a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de superficie celular específico. En una realización, estas células pueden entonces aislarse y re-mezclarse con las perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de la superficie celular adicionales. Las células se pasan de nuevo a través de un campo magnético, las aislando las células que se unen ambas a los anticuerpos. Tales células pueden ser diluidas en platos separados, tales como placas de microtitulación para el aislamiento clonal.

Las células de la placenta aisladas también se pueden caracterizar y/o clasificar en función de la morfología celular y las características de crecimiento. Por ejemplo, las células de la placenta aisladas pueden ser caracterizadas por tener, y/o se seleccionan sobre la base de, por ejemplo, una apariencia fibroblastoide en cultivo. Las células de la placenta aisladas también se pueden caracterizar por tener, y/o ser seleccionadas, sobre la base de su capacidad para formar cuerpos tipo embrionarios. En una realización, por ejemplo, las células de la placenta que son fibroblastoides en forma, expresan CD73 y CD105, y producen uno o más cuerpos tipo embrionarios en cultivo son aisladas de otras células de la placenta. En otra realización, las células de la placenta OCT-4⁺ que producen uno o más cuerpos tipo embrionarios en cultivo son aisladas de otras células de la placenta.

En otra realización, las células de la placenta aisladas pueden ser identificadas y caracterizadas por un ensayo de unidad formadora de colonias. Los ensayos de unidades formadoras de colonias se conocen comúnmente en la técnica, tal como el medio MESENCULT™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Columbia británica).

Las células placentarias aisladas pueden ser evaluadas para la viabilidad, el potencial de proliferación, y la longevidad utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como el ensayo de exclusión de azul de tripano, el ensayo de absorción de diacetato de fluoresceína, el ensayo de captación de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y el ensayo de absorción de timidina, el ensayo de proliferación celular de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (para evaluar la proliferación). La longevidad puede determinarse por métodos bien conocidos en la técnica, tales como mediante la determinación del número máximo de duplicación de la población en un cultivo prolongado.

Las células placentarias aisladas, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2, más arriba, también se pueden separar de otras células de la placenta utilizando otras técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, el crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva), la destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); la separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con la aglutinina de soja; los procedimientos de congelación y descongelación; filtración; centrifugación convencional y zonal; la decantación centrífuga (centrifugación contra-corriente); separación por unidad de gravedad; distribución en contracorriente; electroforesis; y similares.

5.4 Cultivo de células placentarias aisladas

5.4.1 Medios de Cultivo

Las células de la placenta aisladas, o poblaciones de células aisladas de la placenta, o células o tejidos de la placenta de las que las células de la placenta crecen, se pueden utilizar para iniciar, o sembrar, cultivos de células. Las células se transfirieron generalmente a recipientes de cultivo de tejidos estériles o bien no recubiertos con la matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, polilisina, CellStart™, y/o proteína de la membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL® (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)), u otra biomolécula adecuada o agente mimético sintético.

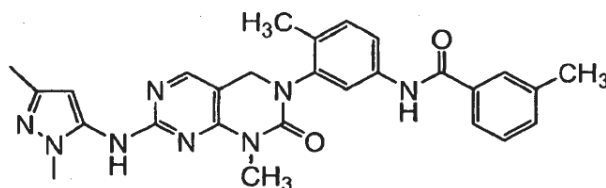
Las células de la placenta aisladas pueden cultivarse en cualquier medio y bajo cualquier condición, reconocidos en la técnica como aceptables para el cultivo de células, por ejemplo, las células madre. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende suero. Las células de la placenta aisladas se pueden cultivar en, por ejemplo, DMEM-LG (Medio Esencial de Dulbecco Modificado, bajo nivel de glucosa)/MCDB 201 (medio basal de fibroblastos de pollo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA + BSA (ácido linoleico-albúmina de suero bovino), dexametasona ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1, y penicilina/estreptomicina; DMEM-HG (glucosa alta) que comprende 10% de suero bovino fetal (FBS); DMEM-HG que comprende FBS al 15%; IMDM (medio de Dulbecco modificado por Iscove) que comprende 10% de SFB, 10% de suero de caballo, y la hidrocortisona; M199 que comprende de 1% a 20% de FBS, EGF, y heparina; α -MEM (medio esencial mínimo) que comprende 10% de FBS, Glutamax™ y gentamicina; DMEM que comprende 10% de FBS, Glutamax™ y gentamicina, etc.

Otros medios que se pueden utilizar para las células de la placenta de cultivo incluyen DMEM (glucosa alta o baja), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM), medio de Liebovitz L-15, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), y CELL-GRO FREE.

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

Las células de la placenta aisladas se pueden cultivar en condiciones de cultivo de tejidos estándar, por ejemplo, en placas de cultivo de tejidos o placas de múltiples pocillos. Las células de la placenta aisladas también pueden ser cultivadas usando un método de la gota colgante. En este método, las células de la placenta aisladas se suspenden en aproximadamente 1×10^4 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 de cultivo de tejidos, por ejemplo, una placa Petri de 100 ml. Las gotas pueden ser, por ejemplo, gotas individuales o múltiples gotas de, por ejemplo, una pipeta multicanal. La tapa se invierte y se coloca cuidadosamente en la parte superior de la parte inferior 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 madre son cultivadas.

En una realización, las células de la placenta aisladas se cultivan en presencia de un compuesto que actúa para mantener un fenotipo no diferenciado en las células de la placenta aisladas. En una realización específica, el compuesto es un 3,4-dihidropiridimol [4,5-d]pirimidina sustituido. En otra realización específica, el compuesto es un compuesto que tiene la siguiente estructura química:



El compuesto se puede poner en contacto con células placentarias aisladas, o una población de células placentarias aisladas, a una concentración de, por ejemplo, entre aproximadamente 1 μM y aproximadamente 10 μM .

5.4.2 Expansión y proliferación de las células de la placenta

- 5 Una vez se tiene una célula placentaria aislada, o una población de células placentarias aisladas (por ejemplo, una célula de placenta o población de células de la placenta separada de al menos el 50% de las células de la placenta con las que la célula madre o una población de células madre se asocia normalmente in vivo), la célula o población de células se puede hacer proliferar y expandirse in vitro. Por ejemplo, una población de las células de la placenta aisladas puede cultivarse en recipientes de cultivo de tejidos, por ejemplo, placas, frascos, placas de múltiples pocillos, o similares, durante un tiempo suficiente para que las células proliferen hasta el 70-90% de confluencia, es decir, hasta que las células y su progenie ocupen el 70-90% de la superficie del cultivo del recipiente de cultivo de tejidos.

- 15 Las células de la placenta aisladas pueden ser sembradas en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. Por ejemplo, las células se pueden sembrar de baja densidad (por ejemplo, aproximadamente de 1000 a aproximadamente 5000 células/cm²) a alta densidad (por ejemplo, aproximadamente 50.000 o más células/cm²). En una realización preferida, las células se cultivan en presencia de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO₂ en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O₂ en aire, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento de O₂ en aire. Las células preferiblemente se cultivan de 20 aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente 37°C. Las células son preferiblemente cultivadas en una incubadora. El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. Las células de la placenta, por ejemplo, las células madre de la placenta o las células multipotentes de la placenta, preferiblemente se cultivan en bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína, o similares).

- 25 Una vez que se obtiene una confluencia de menos de 100%, por ejemplo, de 70% a 90%, las células pueden ser pasadas. Por ejemplo, las células pueden tratarse enzimáticamente, por ejemplo, con tripsina, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, para separarlas de la superficie de cultivo de tejidos. Después de retirar las células mediante pipeteo y contar las células, a unas 10.000-100.000 células/cm² se pasan a un nuevo recipiente de cultivo que contiene medio de cultivo fresco. Típicamente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del cual se retiraron las células de la placenta aisladas. Las células placentarias aisladas pueden ser pasadas aproximadamente, al menos, o no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, o 20 veces, o más.

5.4.3 Poblaciones de células placentarias aisladas

- 35 También se proporcionan en este documento poblaciones de células placentarias aisladas, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2, anteriormente, útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Las poblaciones de células de la placenta aisladas se pueden aislar directamente de una o más placentas; es decir, la población de células puede ser una población de células de la placenta, que comprenda las células de la placenta aisladas, en el que las células de la placenta aisladas se obtienen, o están contenidas dentro, perfundidas, u obtenidas, o contenidas dentro del tejido placentario alterado, por ejemplo, el digestato del tejido de la placenta (es decir, la recolección de células obtenidas por digestión enzimática de una placenta o parte de la misma). Las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria también pueden ser cultivadas y expandidas para producir poblaciones de las células de la placenta aisladas. Las poblaciones de células de la placenta, que comprenden las células de la placenta aisladas, también pueden ser cultivadas y expandidas para producir poblaciones de células de la placenta.

- 45 Las poblaciones de células de la placenta útiles en los métodos de tratamiento proporcionados en este documento comprenden las células placentarias aisladas, por ejemplo, las células placentarias aisladas como se describe en la Sección 5.4.2 en el presente documento. 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 de la placenta son células de la placenta aisladas. Es decir, una población de las células de la placenta aisladas puede comprender, por ejemplo, tanto como 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de células que no son las células placentarias aisladas.

- 50 Las poblaciones de células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden ser producidas, por ejemplo, por la selección de células de la placenta aisladas, tanto si proceden de la digestión enzimática como de la perfusión, que expresan marcadores particulares y/o características de

cultivos particulares o morfológicas. En una realización, por ejemplo, se proporciona en el presente documento un método de producción de una población de células mediante la selección de células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD200 y carecen de expresión de HLA-G; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, una población de células se produce mediante la selección de células de la placenta que expresan CD200 y carecen de la expresión de HLA-G, y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, una población de células se produce mediante la selección de células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73, CD105, y CD200; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, una población de células se produce mediante la identificación de células de la placenta que expresan CD73, CD105, y CD200, y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD200 y OCT-4; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que expresan CD200 y OCT-4, y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo tipo embrionario; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo tipo embrionario, y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células.

En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73 y CD105, y carecen de la expresión de HLA-G; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que expresan CD73 y CD105 y carecen de la expresión de HLA-G, y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, el método de producción de una población de células comprende la selección de células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo tipo embrionario; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que expresan OCT-4, y facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo tipo embrionario, y el aislamiento de dichas células de otras células para formar una población de células.

En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD10 y CD105, y no expresan CD34; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que expresan CD10 y CD105, y no expresan CD34, y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD10, CD105, y CD200, y no expresan CD34; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que expresan CD10, CD105, y CD200, y no expresan CD34, y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización específica, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD10, CD90, CD105 y CD200, y no expresan CD34 y CD45; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En otra realización específica, se produce una población de células mediante la selección de células de la placenta que expresan CD10, CD90, CD105 y CD200, y no expresan CD34 y CD45, y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células.

La selección de poblaciones de células que comprenden células de la placenta que tengan cualquiera de las combinaciones de marcadores descritos en la Sección 5.2.2, más arriba, se puede aislar o se obtiene de manera similar.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, la selección de las poblaciones de células aisladas adicionalmente puede comprender la selección de células de la placenta que expresan ABC-p (una proteína transportadora ABC específica de placenta; véase, por ejemplo, Allikmets y col., Cancer Res. 58(23): 5337-9 (1998)). El método también puede comprender la selección de células que presentan al menos una característica específica para, por ejemplo, una célula madre mesenquimal, por ejemplo, la expresión de CD44, la expresión de CD90, o la expresión de una combinación de los anteriores.

En las realizaciones anteriores, el sustrato puede ser cualquier superficie sobre el que el cultivo y/o la selección de las células, por ejemplo, las células placentarias aisladas, se pueden lograr. Típicamente, el sustrato es de plástico, por ejemplo, una placa de cultivo de tejido o placa de plástico de múltiples pocillos. El plástico del cultivo tisular se puede recubrir con una biomolécula, por ejemplo, la laminina o la fibronectina.

5 Las células, por ejemplo, las células placentarias aisladas, se pueden seleccionar para una población de células de la placenta mediante cualquier medio conocido en la técnica de selección de células. Por ejemplo, las células pueden ser seleccionadas utilizando un anticuerpo o anticuerpos para uno o más marcadores de la superficie celular, por ejemplo, en citometría de flujo o FACS. La selección puede llevarse a cabo utilizando anticuerpos conjuntamente con perlas magnéticas. Los anticuerpos que son específicos para los marcadores relacionados con
10 las células madre determinadas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos contra OCT-4 (Abcam, Cambridge, MA), CD200 (Abcam), HLA-G (Abcam), CD73 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), CD105 (Abcam; Biorad International, Saco, ME), etc. Los anticuerpos frente a otros marcadores también están disponibles comercialmente, por ejemplo, CD34, CD38 y CD45 están disponibles de, por ejemplo, StemCell Technologies o Biorad International.

15 Las poblaciones de células de la placenta aisladas pueden comprender células de la placenta que no son células madre, o células que no son células de la placenta.

Las poblaciones de células aisladas que comprenden células adherentes derivadas de la placenta descritas en este documento pueden comprender un segundo tipo de célula, por ejemplo, células de la placenta que no son células adherentes derivadas de la placenta, o, por ejemplo, células que no son células de la placenta. Por ejemplo, una
20 población aislada de células adherentes derivada de la placenta puede comprender, por ejemplo, se puede combinar con, una población de un segundo tipo de células, en el que dicho segundo tipo de célula son, por ejemplo, células madre embrionarias, células de la sangre (por ejemplo, la sangre de la placenta, células de sangre de la placenta, la sangre del cordón umbilical, células de la sangre del cordón umbilical, sangre periférica, células de sangre periférica, células nucleadas de la sangre de la placenta, la sangre del cordón umbilical, o sangre periférica, y similares),
25 células madre aisladas de la sangre (por ejemplo, células madre aisladas de la sangre de la placenta, la sangre del cordón umbilical o la sangre periférica), células nucleadas de perfundido de la placenta, por ejemplo, células nucleadas totales de perfundido de la placenta; células madre del cordón umbilical, las poblaciones de células nucleadas derivadas de la sangre, células estromales mesenquimales derivadas de médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, células madre derivadas de médula ósea hematopoyéticas, la médula
30 ósea cruda, células madre adultas (somáticas), poblaciones de células madre contenidas dentro de tejidos, células cultivadas, por ejemplo, células madre cultivadas, las poblaciones de células completamente diferenciadas (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células musculares, células cardíacas, etc.), pericitos, y similares. En una realización específica, una población de células que comprende células adherentes placentarias derivadas comprende células madre de la placenta o células del cordón umbilical. En ciertas
35 realizaciones en las que el segundo tipo de célula es sangre o células de la sangre, los eritrocitos se han retirado de la población de células.

En una realización específica, el segundo tipo de célula es una célula madre hematopoyética. Tales células madre hematopoyéticas pueden estar, por ejemplo, contenidas dentro de la placenta sin procesar, la sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en las células nucleadas totales procedentes de sangre de la placenta, la sangre del
40 cordón umbilical o sangre periférica; en una población aislada de células CD34 de la sangre de la placenta, la sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en la médula ósea sin elaborar; en las células nucleadas totales procedentes de la médula ósea; en una población aislada de células CD34 de la médula ósea, o similares.

En otra realización, una población aislada de células adherentes derivadas de la placenta se combina con una pluralidad de células adultas o progenitoras del sistema vascular. En diversas realizaciones, las células son células
45 endoteliales, células progenitoras endoteliales, miocitos, cardiomiocitos, pericitos, angioblastos, mioblastos o cardiomioblastos.

En una otra realización, el segundo tipo celular es un tipo de células no embrionarias manipuladas en cultivo con el fin de expresar marcadores de pluripotencia y funciones asociadas con las células madre embrionarias

En realizaciones específicas de las poblaciones aisladas anteriores de las células adherentes derivadas de la placenta, cualquiera o ambas de las células adherentes derivadas de la placenta y las células de un segundo tipo
50 son autólogas o alogénicas para un destinatario de las células.

En otra realización específica, la composición comprende células adherentes derivadas de la placenta, y las células madre embrionarias. En otra realización específica, la composición comprende células adherentes derivadas de la placenta y del estroma mesenquimal o células madre, por ejemplo, estromales mesenquimales derivadas de la médula ósea o células madre. En otra realización específica, la composición comprende células madre hematopoyéticas derivadas de la médula ósea. En otra realización específica, la composición comprende células de la placenta derivadas adherentes y células progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea, la sangre fetal, sangre del cordón umbilical, sangre de la placenta, y/o sangre periférica. En otra realización específica, la composición comprende células adherentes placentarias derivadas y
55

células madre somáticas. En una realización más específica, dicha célula madre somática es una célula madre neural, una célula madre hepática, una célula madre de páncreas, una célula madre endotelial, una célula madre cardíaca o una célula madre de músculo.

5 En otras realizaciones específicas, el segundo tipo de células comprende aproximadamente, al menos, o no más de, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, o 50% de las células en dicha población. En otras realizaciones específicas, las PDAC en dicha composición comprenden al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% de las células en dicha composición. En otras realizaciones específicas, las células adherentes derivadas de la placenta comprenden aproximadamente, por lo menos, o no más de, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, o 45% de las células en dicha población.

10 Las células en una población aislada de células adherentes derivadas de la placenta se pueden combinar con una pluralidad de células de otro tipo, por ejemplo, con una población de células madre, en una relación de aproximadamente 100.000.000: 1, 50000000: 1, 20000000: 1, 10000000: 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, 5000: 1, 2000: 1, 1000: 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 el número de células nucleadas totales en cada población. Las células en una población aislada de células adherentes derivadas de la placenta se pueden combinar con una pluralidad de células de una pluralidad de tipos de células, también.

20 En otras realizaciones, una población de las células de la placenta se describe en el presente documento, por ejemplo, las PDAC descritas anteriormente se combinan con células adherentes placentarias osteogénicas (OPAC), por ejemplo, los catálogos en línea que se describen en la Publicación de Patente N° 2010/0047214, titulada "Méthods and compositions for treatment of bone defects with placental stem cells", o se combinan con células angiogénicas amnios derivadas (AMDACs), por ejemplo, las AMDAC descritas en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2010/0124569, titulada "Amnion derived angiogenic cells".

25 5.5 Producción de un banco de células placentarias

Las células aisladas de placentas posparto, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2, más arriba, se pueden cultivar en una serie de diferentes maneras para producir un conjunto de lotes, por ejemplo, en el que una lote es un conjunto de dosis individuales administrables, de células de la placenta aisladas. Tales lotes pueden, por ejemplo, obtenerse a partir de células de perfundido de la placenta o de células de tejido de la placenta digerido con enzimas. Los conjuntos de lotes de células de la placenta, obtenidos a partir de una pluralidad de placentas, se pueden organizar en un banco de células de la placenta aisladas para, por ejemplo, el almacenamiento a largo plazo. Generalmente, las células de la placenta adherentes al plástico del cultivo de tejidos se obtienen a partir de un cultivo inicial de material de la placenta para formar un cultivo de siembra, que se expande en condiciones controladas para formar poblaciones de células de números aproximadamente equivalentes de duplicaciones. Las porciones son derivadas preferiblemente del tejido de una sola placenta, pero se pueden derivar a partir del tejido de una pluralidad de placentas.

40 Los lotes de las células de la placenta se pueden obtener como sigue. El tejido placentario se rompe primero, por ejemplo, mediante el picado, se digiere con una enzima adecuada, por ejemplo, tripsina o colagenasa (véase la Sección 5.3.3, más arriba). El tejido de la placenta comprende preferiblemente, por ejemplo, todo el amnios, todo el corion, o ambos, de una sola placenta, pero puede comprender sólo una parte de cualquiera de los amnios o del corion. El tejido digerido se cultiva, por ejemplo, durante aproximadamente 1 a 3 semanas, preferiblemente aproximadamente 2 semanas. Después de la eliminación de las células no adherentes, las colonias de alta densidad que se forman se recogen, por ejemplo, mediante tratamiento con tripsina. Estas células se recogen y se resuspenden en un volumen conveniente de medio de cultivo, y luego se utilizan para sembrar cultivos de expansión. Los cultivos de expansión pueden ser cualquier disposición de aparatos de cultivo de células separadas, por ejemplo, una fábrica celular de NUNC™. Las células pueden subdividirse en cualquier grado con el fin de sembrar cultivos de expansión con, por ejemplo, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , o 10×10^4 células/cm². Preferiblemente, de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^4 células/cm² se utilizan para sembrar cada cultivo de expansión. El número de cultivos de expansión puede ser mayor o menor en número dependiendo de la placenta(s) particular, del que se obtienen las células.

55 Los cultivos de expansión se cultivan hasta que la densidad de las células en el cultivo alcanza un cierto valor, por ejemplo, aproximadamente 1×10^5 células/cm². Las células pueden recolectarse y criopreservarse en este punto, o a pasarse en nuevos cultivos de expansión como se describe anteriormente. Las células pueden ser pasadas, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 veces antes de su uso. Un registro del número acumulado de duplicaciones de la población se mantiene preferiblemente durante el cultivo(s) de expansión. Las células de un cultivo se pueden ampliar para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 ó 40 duplicaciones, o hasta 60 duplicaciones. Preferiblemente, sin embargo, el número de duplicaciones de la población, con anterioridad a la división de la población de células en dosis individuales, es de

aproximadamente 15 a aproximadamente 30. Las células pueden ser cultivadas continuamente durante todo el proceso de expansión, o se pueden congelar en uno o más puntos durante la expansión.

Las células que se utilizarán para las dosis individuales se pueden congelar, por ejemplo, criopreservarse para su uso posterior. Las dosis individuales pueden comprender, por ejemplo, de aproximadamente 1 millón a aproximadamente 50 millones de células por ml, y pueden comprender entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^{10} células en total.

Por lo tanto, un banco de células de la placenta puede hacerse por un método que comprenda: expandir las células de la placenta del cultivo primario a partir de una placenta después del parto humano para una primera pluralidad de duplicaciones de la población; criopreservar dichas células de la placenta para formar un Banco de Células Maestro; expandir una pluralidad de células de la placenta del Banco de Células Maestro para una segunda pluralidad de duplicaciones de la población; criopreservar dichas células placentarias para formar un Banco de Células de Trabajo; ampliar una pluralidad de células de la placenta desde el Banco de Células de Trabajo para una tercera pluralidad de duplicaciones de la población; y criopreservar dichas células placentarias en dosis individuales, en el que dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células de la placenta. Opcionalmente, una pluralidad de células de la placenta a partir de dicha tercera pluralidad de duplicaciones de la población se puede ampliar para una cuarta pluralidad de duplicaciones de la población y criopreservarse en dosis individuales, en el que dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células de la placenta.

Dichas células placentarias del cultivo primario pueden comprender células de la placenta de perfusión placentaria. Dichas células de la placenta del cultivo primario pueden comprender células de la placenta de tejido placentario digerido. Dichas células placentarias del cultivo primario pueden comprender células de la placenta de perfusión placentaria y de tejido placentario digerida. La totalidad de dichas células de la placenta en dicho cultivo primario de células placentarias pueden ser de la misma placenta. El método puede comprender además la etapa de seleccionar células de la placenta CD200⁺ o HLA-G⁻ a partir de dicha pluralidad de dichas células de la placenta a partir de dicho Banco de Células de Trabajo para formar dosis individuales. Dichas dosis individuales pueden comprender de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^5 células de la placenta. Dichas dosis individuales pueden comprender de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 células de la placenta. Dichas dosis individuales pueden comprender de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 células de la placenta. Dichas dosis individuales pueden comprender de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 células de la placenta. Dichas dosis individuales pueden comprender de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^9 células de la placenta. Dichas dosis individuales pueden comprender de aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} células de la placenta.

Preferiblemente, el donante del que se obtiene la placenta (por ejemplo, la madre) se somete a la prueba de al menos un patógeno. Si la madre da positivo por un patógeno probado, todo el lote de la placenta se descarta. Tal prueba se puede realizar en cualquier momento durante la producción de lotes de células de la placenta, por ejemplo, durante el cultivo de expansión. Los patógenos para los que se prueba su presencia pueden incluir, sin limitación, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, virus de la inmunodeficiencia humana (tipos I y II), citomegalovirus, virus del herpes, y similares.

5.6 Conservación de las células de la placenta

Las células placentarias aisladas, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en la Sección 5.3.2, más arriba, pueden ser conservadas, es decir, colocadas en condiciones que permitan el almacenamiento a largo plazo, o condiciones que inhiban la muerte celular, por ejemplo, por apoptosis o necrosis.

Las células de la placenta pueden conservarse utilizando, por ejemplo, una composición que comprenda un inhibidor de la apoptosis, inhibidor de la necrosis y/o un perfluorocarbono de transporte de oxígeno, como se describe en la publicación de solicitud relacionada de Estados Unidos N° 2007/0190042. Un método de conservación de una población de células, útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, comprende poner en contacto dicha población de células con una composición de recogida de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono de transporte de oxígeno, en el que dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células, en comparación con una población de células no puestas en contacto con el inhibidor de la apoptosis. Por ejemplo, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de caspasa. De forma alternativa, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de JNK. Específicamente, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación o la proliferación de dichas células. Dicha composición de recogida de células puede comprender dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono que transporta oxígeno en fases separadas. De forma alternativa, dicha composición de recogida de células puede comprender dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono que transporta oxígeno en una emulsión. La composición de recogida de células puede comprender adicionalmente un emulsionante, por ejemplo, lecitina. Dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono pueden estar entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 25°C en el momento de poner en contacto las células. Dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono pueden estar entre aproximadamente 2°C y 10°C, o entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 5°C, en el momento del contacto de las células. Dicho contacto se puede realizar durante el transporte de dicha población de células. De forma alternativa, dicho contacto se puede realizar durante la congelación y descongelación de dicha población de células.

Las poblaciones de células de la placenta pueden conservarse, por ejemplo, mediante un método que comprende poner en contacto dicha población de células con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto de preservación de órganos, en el que dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células, en comparación con una población de células no puestas en contacto con el inhibidor de la apoptosis. Por ejemplo, el compuesto de preservación de órganos es la solución UW (descrita en la Patente de EE.UU. No. 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 EE.UU. No. 5.552.267. De forma alternativa, dicho compuesto de preservación de órganos puede ser el almidón de hidroxietilo, ácido lactobiónico, rafinosa, o una combinación de los mismos. La composición de recogida de células puede comprender adicionalmente un perfluorocarbono de transporte de oxígeno, ya sea en dos fases o como una emulsión.

Las células de la placenta se pueden poner en contacto con una composición de recogida de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y el perfluorocarbono que transporta el oxígeno, el compuesto de preservación de órganos, o una combinación de los mismos, durante la perfusión. De forma alternativa, dichas células se pueden poner en contacto durante un proceso de alteración del tejido, por ejemplo, la digestión enzimática. Las células de la placenta se pueden poner en contacto con dicho compuesto de recogida de células después de la recolección por perfusión, o después de la recogida por la ruptura de tejido, por ejemplo, la digestión enzimática.

Típicamente, durante la recogida de las células de la placenta, el enriquecimiento y el aislamiento, es preferible reducir al mínimo o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y la tensión mecánica. Por lo tanto, una célula, o población de células, puede exponerse a una condición hipóxica durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento por menos de seis horas durante dicha preservación, en el que una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración normal de oxígeno en la sangre. Dicha población de células se puede exponer a dicha condición hipóxica durante menos de dos horas durante dicha conservación. De forma alternativa, dicha población de células se puede exponer a dicha condición hipóxica durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no está expuesta a una condición de hipoxia, durante la recogida, el enriquecimiento o aislamiento. Dicha población de células puede no exponerse a esfuerzo cortante durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento.

Las células de la placenta pueden ser criopreservadas, por ejemplo, en un medio de criopreservación en pequeños contenedores, por ejemplo, ampollas. El medio de criopreservación adecuado incluye, pero no se limita a, medio de cultivo, incluyendo, por ejemplo, medio de crecimiento, o medio de congelación de células, por ejemplo medio de congelación de células disponible en el mercado, por ejemplo, C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de criopreservación comprende preferiblemente DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración de aproximadamente 2% a aproximadamente 15% (v/v), por ejemplo, aproximadamente 10% (v/v). El medio de criopreservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las células de la placenta se enfrían preferiblemente a aproximadamente 1°C/min durante la criopreservación. Una temperatura de criopreservación preferida es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, preferiblemente de aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C. Las células criopreservadas pueden ser transferidas a nitrógeno líquido antes de la descongelación para su uso. Por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. La criopreservación también se puede hacer usando un congelador a velocidad controlada. Las células criopreservadas se descongelan preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37°C.

5.7 Composiciones que comprenden células placentarias aisladas

Las células de la placenta descritas en este documento, por ejemplo, en la Sección 5.4.2, se pueden combinar con cualquier compuesto, composición o dispositivo fisiológicamente aceptable o médicamente aceptable, para uso en los métodos y composiciones descritas en el presente documento. Las composiciones útiles en los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento pueden comprender una cualquiera o más de las células de la placenta descritas en este documento (véase la Sección 5.4.2, más arriba). En ciertas realizaciones, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una composición que comprende células de la placenta en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Véase la Sección 5.9.2, a continuación.

Una composición que comprende las células placentarias aisladas, además, puede comprender una matriz, por ejemplo, una matriz descelularizada o una matriz sintética. Dicha matriz puede ser una estructura tridimensional. Específicamente, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina, o vitronectina. De forma alternativa, la matriz es una membrana amniótica o un biomaterial derivado de la membrana amniótica. Dicha matriz puede comprender una proteína de membrana extracelular. Además, dicha matriz puede comprender un compuesto sintético o un compuesto bioactivo. Dicho compuesto bioactivo puede ser un factor de crecimiento, citoquinas, anticuerpos, o molécula orgánica de menos de 5.000 daltons.

Una composición útil en los métodos de tratamiento dentro del contexto de la invención puede comprender un medio acondicionado por cualquiera de las células de la placenta precedentes, o cualquiera de las poblaciones de células placentarias anteriores.

5.7.1 Células placentarias aisladas criopreservadas

Las poblaciones de células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritas en el presente documento se pueden conservar, por ejemplo, criopreservar para su uso posterior. Los métodos para la crioconservación de células, tales como células madre, son bien conocidos en la técnica. Las poblaciones de células placentarias aisladas se pueden preparar en una forma que sea fácilmente administrable a un individuo, por ejemplo, una población de células de la placenta aisladas que esté contenida dentro de un recipiente que sea adecuado para uso médico. Tal recipiente puede ser, por ejemplo, una jeringa, una bolsa estéril de plástico, un matraz, tarro, u otro recipiente desde el que la población de células de la placenta aisladas se pueda dispensar 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 destinatario. El recipiente, en ciertas realizaciones, es el que permite la crioconservación de la población de células combinadas.

La población de células de la placenta aisladas criopreservadas puede comprender células placentarias aisladas derivadas de un solo donante o de múltiples donantes. La población de células de la placenta aisladas puede ser completamente HLA compatible frente a un destinatario, o parcialmente o completamente HLA coincidente.

Por lo tanto, en una realización, las células placentarias aisladas se pueden utilizar en los métodos descritos en este documento y en la forma de una composición que comprende una población de células de la placenta adherentes al plástico del cultivo de tejidos en un recipiente. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son criopreservadas. En otra realización específica, el contenedor es una bolsa, matraz, o tarro. En otra realización específica, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. En otra realización específica, dicha bolsa es adecuada, permite o facilita la administración intravenosa de dicha población de células de la placenta aisladas, por ejemplo, por infusión intravenosa. La bolsa puede comprender múltiples lúmenes o compartimentos que están interconectados para permitir la mezcla de las células de la placenta aisladas y una o más otras soluciones, por ejemplo, un fármaco, antes de o durante la administración. En otra realización específica, la composición comprende uno o más compuestos que facilitan la criopreservación de la población celular combinada. En otra realización específica, dicha población de células aisladas de la placenta está contenida dentro de una solución acuosa fisiológicamente aceptable. En otra realización específica, dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable es una solución de NaCl al 0,9%. En otra realización específica, dicha población de células de la placenta aisladas comprende células de la placenta que son coincidentes con HLA respecto a un destinatario de dicha población celular. En otra realización específica, dicha población celular combinada comprende células de la placenta que son al menos parcialmente HLA no coincidentes respecto a un destinatario de dicha población celular. En otra realización específica, dichas células aisladas de la placenta se derivan de una pluralidad de donantes.

En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas en el recipiente son CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺ y CD200⁺ células de la placenta aisladas, en donde dichas células han sido crioconservadas, y están contenidas en un recipiente. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ también son CD45⁺ o CD90⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ también son CD45⁺ y CD90⁺. En otra realización específica, las células de la placenta CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ son adicionalmente una o más de CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD62E⁺, CD62L⁺, CD62P⁺, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁺, CD86⁺, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁺, CD144/VE-cadherina^{dim}, CD184/CXCR4⁺, CD133⁺, OCT-4⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, ABC-p⁺, KDR⁺ (VEGFR2⁺), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP, DQ,DR,HLA-G⁺, o ligando Muerte-1 programado (PDL1⁺), o cualquier combinación de los mismos. En otra realización específica, las células de la placenta CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ son, además, CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD45⁺, CD54/ICAM⁺, CD62E⁺, CD62L⁺, CD62P⁺, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁺, CD86⁺, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁺, CD144/VE-cadherina^{dim}, CD184/CXCR4⁺, CD133⁺, OCT-4⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, ABC-p⁺, KDR⁺ (VEGFR2⁺), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁺, HLA-G⁺, y ligando Muerte-1 programado (PDL1⁺).

En ciertas otras realizaciones, las células placentarias aisladas de referencia anteriores son células de la placenta aisladas CD200⁺, HLA-G⁺, en donde dichas células han sido crioconservadas, y están contenidas en un recipiente. En otra realización, las células de la placenta aisladas son células CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ que han sido crioconservadas y están contenidas dentro de un recipiente. En otra realización, las células de la placenta aisladas son células madre CD200⁺, OCT-4⁺ que han sido crioconservadas y están contenidas dentro de un recipiente. En otra realización, las células de la placenta aisladas son células CD73⁺, CD105⁺ que han sido crioconservadas, y están contenidos dentro de un contenedor, y en el que dichas células de la placenta aisladas facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios cuando se cultivan con una población de células de la placenta en condiciones que permitan la formación de cuerpos tipo embrionarios. En otra realización, las células de la placenta aisladas son células CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ que han sido criopreservadas, y están contenidos dentro de un recipiente. En otra realización, las células de la placenta aisladas son células de la placenta OCT-4⁺ que han sido criopreservadas, y están contenidas dentro de un recipiente, y en el que dichas células facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios cuando se cultivan con una población de células de la placenta en condiciones que permitan la formación de cuerpos tipo embrionarios.

Las células placentarias aisladas de referencia anteriores son las células madre de la placenta o células multipotentes placentarias que son CD34⁺, CD10⁺ y CD105⁺ detectadas por citometría de flujo (por ejemplo, PDAC).

En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo neuronal, células de un fenotipo osteogénico, o células de un fenotipo condrogénico. De acuerdo con la invención, las células de la placenta aisladas CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ son, además, CD200⁺. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ son, además, CD90⁺ o CD45⁺, como se detectan por citometría de flujo. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ son, además, CD90⁺ o CD45⁺, como se detectan por citometría de flujo. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son, además, CD90⁺ o CD45⁺, como se detectan por citometría de flujo. En otra realización específica, las células CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son, además, CD90⁺ y CD45⁺, como se detecta por citometría de flujo. En otra realización específica, las células CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD90⁺, CD45⁺ son, además, CD80⁺ y CD86⁺, como se detecta por citometría de flujo. En otra realización específica, las células CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ son, además, una o más de CD29⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD80⁺, CD86⁺, SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización específica, las células son, además, CD44⁺. En una realización específica de cualquiera de las células de la placenta aisladas CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺ anteriores, las células son, además, una o más de CD117⁺, CD133⁺, KDR⁺ (VEGFR2⁺), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁺, y/o PDL1⁺.

En una realización específica de cualquiera de las células placentarias aisladas criopreservadas anteriores, dicho recipiente es una bolsa. En diversas realizaciones específicas, dicho recipiente comprende aproximadamente, por lo menos, o como máximo 1×10^6 dichas células placentarias aisladas, 5×10^6 dichas células placentarias aisladas, 1×10^7 dichas células placentarias aisladas, 5×10^7 dichas células placentarias aisladas, 1×10^8 dichas células placentarias aisladas, 5×10^8 dichas células placentarias aisladas, 1×10^9 dichas células placentarias aisladas, 5×10^9 dichas células de la placenta aisladas, 1×10^{10} dichas células placentarias aisladas, o 1×10^{10} dicho células de la placenta aisladas. En otras realizaciones específicas de cualquiera de las poblaciones criopreservadas anteriores, dichas células placentarias aisladas han sido pasadas 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 células placentarias aisladas criopreservadas anteriores, dichas células de la placenta aisladas se han ampliado dentro de dicho recipiente.

En ciertas realizaciones, una dosis unitaria única de células adherentes placentaria derivadas puede comprender, en diversas realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células adherentes derivadas de la placenta. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden las poblaciones de células adherentes derivadas de la placenta, que comprenden 50% de células viables o más (es decir, al menos 50% de las células en la población son funcionales o están vivas). Preferiblemente, al menos 60% de las células en la población son viables. Más preferiblemente, al menos 70%, 80%, 90%, 95%, o 99% de las células en la población en la composición farmacéutica son viables.

5.7.2 Células de la placenta genéticamente modificadas

Se proporciona además en el presente documento células de la placenta, por ejemplo, cualquiera de las células multipotentes de la placenta o células de la placenta descritas en la Sección 5.2.2, más arriba, o composiciones farmacéuticas que comprenden tales células de la placenta, en el que las células de la placenta han sido diseñadas genéticamente para producir citocinas recombinantes o exógenos asociados o que promueven la angiogénesis. En ciertas realizaciones, dichas proteínas que facilitan la angiogénesis son uno o más del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (por ejemplo, VEGFD), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, FGF2), angiogenina (ANG), factor de crecimiento epidérmico (EGF), proteína epitelial-activadora de neutrófilos 78 (ENA-78), folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), proteína oncofónica de crecimiento regulado (GRO), interleucina-6 (IL-6), IL-8, la leptina, proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), MCP-3, factor de crecimiento submunit B derivado de plaquetas (PDGFB), RANTES, factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1), trombopoietina (Tpo), inhibidor tisular de las metaloproteinasas 1 (TIMP1), TIMP2, y/o del receptor del activador de plasminógeno uroquinasa (uPAR).

Pueden ser utilizados métodos para las células de ingeniería genética, por ejemplo, con vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores virales adeno-asociados, polietilenglicol, u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen el uso de vectores de expresión que transportan y expresan moléculas de ácido nucleico en las células. (Véase Geoddel; Gen Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California. (1990)). El ADN del vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), y otros libros de texto de laboratorio.

Las células de la placenta, por ejemplo, las PDAC descritas en la Sección 5.2, anteriormente, pueden ser genéticamente modificadas por introducción de ADN o ARN en la célula, por ejemplo, ADN o ARN que codifica una proteína de interés, por métodos que incluyen transferencia viral, incluyendo el uso de ADN o vectores virales de ARN, tales como retrovirus (incluidos los virus lenti), virus de simio 40 (SV40), adenovirus, virus Sindbis, y el virus del papiloma bovino, por ejemplo; transferencia química, incluyendo la transfección con fosfato de calcio y los métodos de transfección de DEAE dextrano; la transferencia de la fusión de membranas, utilizando vesículas de membrana cargadas con ADN tales como liposomas, fantasmas de glóbulos rojos, y protoplastos, por ejemplo; o

técnicas de transferencia físicas, tales como microinyección, electroporación o transferencia de ADN desnudo. Las células de la placenta pueden ser alteradas genéticamente mediante la inserción de ADN exógeno, o por sustitución de un segmento del genoma celular con ADN exógeno. La inserción de la secuencia(s) de ADN exógeno puede llevarse a cabo, por ejemplo, por recombinación homóloga o por integración viral en el genoma de la célula huésped, o incorporando el ADN en la célula, en particular en su núcleo, usando un vector de expresión de plásmido y una secuencia de localización nuclear. El ADN puede comprender uno o más promotores que permitan la inducción positiva o negativa de la expresión de la proteína de interés utilizando ciertos productos químicos/fármacos, por ejemplo, tetraciclina; los promotores pueden, en otras realizaciones, ser constitutivos.

La transfección con fosfato de calcio puede ser utilizada para introducir, por ejemplo, ADN de plásmido que contiene una secuencia de polinucleótido que codifica la proteína de interés, en una célula. En ciertas realizaciones, el ADN se combina con una solución de cloruro de calcio, después se añade a una solución tamponada con fosfato. Una vez que se ha formado un precipitado, se añade la solución directamente a las células cultivadas. El tratamiento con DMSO o glicerol se puede utilizar para mejorar la eficiencia de la transfección, y los niveles de transfectantes estables se pueden mejorar usando etanosulfonato de bis-hidroxietilamino (BES). Los sistemas de transfección de fosfato de calcio están comercialmente disponibles (por ejemplo, PROFECTION®, Promega Corp., Madison, Wis.). También puede ser utilizada la transfección con DEAE-dextrano.

Las células de la placenta aisladas también pueden ser modificadas por ingeniería genética por microinyección. En ciertas realizaciones, una micropipeta de vidrio es guiada en el núcleo de las células bajo un microscopio de luz para inyectar ADN o ARN.

Las células de la placenta también se pueden modificar genéticamente utilizando la electroporación. En ciertas realizaciones, se añade ADN o ARN a una suspensión de células cultivadas, y se coloca la suspensión de células de ADN/ARN entre dos electrodos y se someten a un pulso eléctrico, causando una permeabilidad transitoria en la membrana externa de la célula que se manifiesta por la aparición de poros a través de la membrana.

La administración liposomal de ADN o ARN para modificar genéticamente las células se puede realizar utilizando liposomas catiónicos, incluyendo opcionalmente dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) o dioleoil fosfatidilcolina (DOPC), por ejemplo, Lipofectin® (Life Technologies, Inc.). Otros sistemas de administración disponibles comercialmente incluyen Effectene™ (Qiagen), DOTAP (Roche Molecular Biochemicals), Eugene 6™ (Roche Molecular Biochemicals), y TRANSFECTAM® (Promega).

Los vectores virales se pueden utilizar para alterar genéticamente células de la placenta mediante la entrega de, por ejemplo, genes diana, polinucleótidos, moléculas antisentido, o secuencias de ribozimas en las células. Los vectores retrovirales son eficaces para transducir células que se dividen rápidamente, aunque un número de vectores retrovirales se han desarrollado para transferir eficazmente ADN en células que no se dividen también. El empaquetamiento de líneas celulares para vectores retrovirales es conocida por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, un vector de ADN retroviral contiene dos LTRs retrovirales de tal manera que una primera LTR se encuentra 5' respecto al promotor de SV40, que está operativamente unido a la secuencia del gen diana clonado en un sitio de multiclonación, seguido de un segundo LTR de 3'. Una vez formado, el vector de ADN retroviral se transfiere a una línea celular de empaquetamiento usando transfección mediada por fosfato de calcio, como se describe anteriormente. Después de aproximadamente 48 horas de producción de virus, el vector viral, que contiene ahora la secuencia del gen objetivo, se cosecha. Los métodos de transfección de células usando vectores lentivirales, virus de herpes recombinantes, vectores adenovirales o vectores de alfavirus son conocidos en la técnica.

La transfección exitosa o transducción de células diana se puede demostrar utilizando marcadores genéticos, en una técnica que se conoce por los expertos en la técnica. La proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*, por ejemplo, ha demostrado ser un marcador eficaz para la identificación y el seguimiento de las células hematopoyéticas modificadas genéticamente. Los marcadores seleccionables alternativos incluyen el gen de la β -Gal, el receptor del factor de crecimiento del nervio truncado, o marcadores seleccionables de fármacos (incluyendo pero no limitado a NEO, MTX, o higromicina).

5.7.3 Composiciones farmacéuticas

Las poblaciones de células placentarias aisladas, por ejemplo, PDAC, o poblaciones de células que comprenden las células placentarias aisladas, se pueden formular en composiciones farmacéuticas para uso in vivo, por ejemplo, en los métodos de tratamiento dentro del contexto de la invención. Tales composiciones farmacéuticas comprenden una población de células placentarias aisladas, o una población de células que comprende células placentarias aisladas, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución salina u otra solución aceptada fisiológicamente aceptable para la administración in vivo. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las células placentarias aisladas descritas en este documento pueden comprender cualquier, o cualquier combinación, de las poblaciones de células placentarias aisladas, o células placentarias aisladas, descritas en otra parte en este documento. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células placentarias aisladas de feto y de madre o ambas fetales y maternas. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento pueden

comprender además células placentarias aisladas obtenidas a partir de un solo individuo o de la placenta, o de una pluralidad de individuos o de placentas.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento pueden comprender cualquier número de células de la placenta aisladas. Por ejemplo, una dosis unitaria única de células de la placenta aisladas puede comprender, en diversas realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células de la placenta aisladas.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender poblaciones de células que comprendan 50% de células viables o más (es decir, al menos 50% de las células en la población son funcionales o están vivas). Preferiblemente, al menos 60% de las células en la población son viables. Más preferiblemente, al menos 70%, 80%, 90%, 95%, o 99% de las células en la población en la composición farmacéutica son viables.

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

Cuando se formula como una solución inyectable, en una realización, la composición farmacéutica comprende aproximadamente de 1% a 1,5% de HSA y 2,5% de dextrano. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 5×10^6 células por mililitro a aproximadamente 2×10^7 células por mililitro en una solución que comprende 5% de HSA y 10% de dextrano, que comprende opcionalmente un inmunosupresor, por ejemplo, ciclosporina A en, por ejemplo, 10 mg/kg.

La composición farmacéutica, por ejemplo, una solución, puede comprender una pluralidad de células, por ejemplo, células placentarias aisladas, por ejemplo, células madre de la placenta o células multipotentes de la placenta, donde dicha composición farmacéutica comprende entre aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro hasta aproximadamente $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células por mililitro. De forma alternativa, la composición farmacéutica puede comprender entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por mililitro y aproximadamente $3,75 \times 10^6$ células por mililitro. La composición farmacéutica puede comprender entre aproximadamente 1×10^6 células/ml y aproximadamente 50×10^6 células/ml, de aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 40×10^6 células/ml, de aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 30×10^6 células/ml, de aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 20×10^6 células/ml, de aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 15×10^6 células/ml, o de aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 10×10^6 células/ml. La composición farmacéutica puede comprender la inexistencia de grumos visibles de células (es decir, no hay grupos de células macro), o sustancialmente ningún tipo de grumos visibles. Como se usa en el presente documento, "grupos de células macro" significa una agregación de células visibles sin aumento, por ejemplo, visible a simple vista, y en general se refiere a una agregación de células mayor de aproximadamente 150 micras. La composición farmacéutica puede comprender aproximadamente 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% o 10% de dextrano, por ejemplo, dextrano -40. Dicha composición puede comprender de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9% de dextrano-40. Dicha composición puede comprender aproximadamente 5,5% de dextrano-40. La composición farmacéutica puede comprender de aproximadamente 1% a aproximadamente 15% de albúmina de suero humano (HSA). La composición farmacéutica comprende aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6,5%, 7,5%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15% de HSA. Específicamente, dichas células han sido criopreservadas y descongeladas. Adicionalmente, dichas células se han filtrado a través de un filtro de $70 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$. En particular, dicha composición comprende la inexistencia de grupos de células visibles. Específicamente, dicha composición comprende menos de aproximadamente 200 grupos de células por cada 10^6 células, en el que dichos grupos de células sólo son visibles bajo un microscopio, por ejemplo, un microscopio de luz. Dicha composición puede comprender menos de aproximadamente 150 grupos de células por cada 10^6 células, en el que dichos grupos de células sólo son visibles bajo un microscopio, por ejemplo, un microscopio de luz. Dicha composición puede comprender menos de aproximadamente 100 grupos de células por cada 10^6 células, en el que dichos grupos de células sólo son visibles bajo un microscopio, por ejemplo, un microscopio de luz.

Específicamente, la composición farmacéutica puede comprender aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro, aproximadamente 5,5% de dextrano-40 (p/v), aproximadamente 10% HSA (p/v), y aproximadamente 5% de DMSO (v/v).

La composición farmacéutica puede comprender una pluralidad de células, por ejemplo, una pluralidad de células de la placenta aisladas en una solución que comprende 10% de dextrano-40, en el que la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro y aproximadamente $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células por mililitro, y en el que dicha composición comprende la inexistencia de grupos de células visibles a simple vista (es decir, no comprende grupos de células de macro). La composición farmacéutica puede comprender entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por mililitro y aproximadamente $3,75 \times 10^6$ células por mililitro. Por ejemplo, dichas células han sido criopreservadas y descongeladas. Dichas células pueden haberse filtrado a través de un filtro de $70 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$. Dicha composición puede comprender menos de aproximadamente 200 grupos de células micro (es decir, grupos de células visibles solamente con aumentos) por cada 10^6 células. La composición farmacéutica puede comprender menos de aproximadamente 150 grupos de células micro por 10^6 células. La

composición farmacéutica puede comprender menos de aproximadamente 100 grupos de células micro por 10^6 células. La composición farmacéutica puede comprender menos de 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, o 2% de DMSO, o menos de 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, o 0,1% de DMSO.

- 5 Dichas composiciones pueden ser producidas por uno de los métodos descritos en este documento. Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende células, en las que la composición farmacéutica se produce por un método que comprende filtrar una solución que comprende células de la placenta, por ejemplo, células madre de la placenta o células multipotentes de la placenta, para formar una solución que contiene células filtrada; diluir la solución que contiene las células filtradas con una primera solución de aproximadamente 1 a 50×10^6 , de 1 a 40×10^6 , de 1 a 30×10^6 , de 1 a 20×10^6 , de 1 a 15×10^6 , o de 1 a 10×10^6 células por mililitro, por ejemplo, antes de la crioconservación; y diluir la solución que contiene las células filtradas resultante con una segunda solución que comprende dextrano, pero no comprende albúmina de suero humano (HSA) para producir dicha composición. Por ejemplo, dicho diluyente tiene no más de aproximadamente 15×10^6 células por mililitro. Por ejemplo, dicho diluyente tiene no más de aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro. Por ejemplo, dicho diluyente tiene no más de aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células por mililitro. Si la solución que contiene las células filtradas, antes de la dilución, comprende menos de aproximadamente 15×10^6 células por mililitro, la filtración puede ser opcional. Si la solución que contiene las células filtradas, antes de la dilución, comprende menos de aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro, la filtración puede ser opcional. Si la solución que contiene las células filtradas, antes de la dilución, comprende menos de aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células por mililitro, la filtración puede ser opcional.
- 10 20 Las células pueden ser criopreservadas entre dicha dilución con una primera solución de dilución y dicha dilución con dicha segunda solución de dilución. La primera solución de dilución puede comprender dextrano y HSA. El dextrano en la primera solución de dilución o la segunda solución de dilución puede ser dextrano de cualquier peso molecular, por ejemplo, dextrano que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 150 kDa. Dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución puede ser aproximadamente 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% o 10% de dextrano. El dextrano en dicha solución primera dilución o dicha segunda solución de dilución puede ser dextrano-40. El dextrano en dicha primera solución de dilución y dicha segunda solución de dilución puede ser dextrano-40. Dicho dextrano-40 en dicha primera solución de dilución es 5,0% de dextrano-40. Dicho dextrano-40 en dicha primera solución de dilución puede ser 5,5% de dextrano-40. Dicho dextrano-40 en dicha segunda solución de dilución puede ser 10% de dextrano-40. Dicho HSA en dicha solución que comprende HSA puede ser de 1 a 15% de HSA. Dicho HSA en dicha solución que comprende HSA puede ser de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15% de HSA. Dicho HSA en dicha solución que comprende HSA puede ser 10% de HSA. Dicha primera solución de dilución puede comprender HSA. Dicho HSA en dicha primera solución de dilución puede ser 10% de HSA. Dicha primera solución de dilución puede comprender un crioprotector. Dicho crioprotector puede ser DMSO. Dicho dextrano-40 en dicha segunda solución de dilución puede tener aproximadamente 10% de dextrano-40. Dicha composición que comprende células puede comprender de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9% de dextrano. La composición farmacéutica puede comprender de aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro a aproximadamente $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células por mililitro. La composición farmacéutica puede comprender de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por mililitro a aproximadamente $3,75 \times 10^6$ células por mililitro.
- 25 30 35 40 La composición farmacéutica puede prepararse por un método que comprende (a) filtrar una solución que contiene células que comprende células de la placenta, por ejemplo, las células madre de la placenta o células multipotentes de la placenta, antes de la crioconservación para producir una solución que contiene células filtradas; (b) crioconservar las células en la solución que contiene células filtrada aproximadamente de 1 a 50×10^6 , de 1 a 40×10^6 , de 1 a 30×10^6 , de 1 a 20×10^6 , de 1 a 15×10^6 , o de 1 a 10×10^6 células por mililitro; (c) descongelar las células; y (d) diluir la solución que contiene las células filtradas de aproximadamente 1: 1 a aproximadamente 1: 11 (v/v) con una solución de dextrano-40. Por ejemplo, si el número de células es inferior a aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro antes de la etapa (a), la filtración es opcional. Las células en la etapa (b) pueden ser criopreservadas a aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro. Las células en la etapa (b) pueden ser criopreservadas en una solución que comprende de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% de dextrano-40 y HSA. Dicha dilución en la etapa (b) puede ser de no más de aproximadamente 15×10^6 células por mililitro.
- 45 50

- De forma alternativa, la composición farmacéutica puede prepararse por un método que comprenda: (a) suspender las células de la placenta, por ejemplo, las células madre de la placenta o células multipotentes de la placenta, en una solución de 5,5% de dextrano-40 que comprende 10% de HSA para formar una solución que contiene células; (B) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 μ m; (C) diluir la solución que contiene células con una solución que comprende 5,5% de dextrano-40, 10% de HSA, y 5% de DMSO aproximadamente de 1 a 50×10^6 , de 1 a 40×10^6 , de 1 a 30×10^6 , de 1 a 20×10^6 , de 1 a 15×10^6 , o de 1 a 10×10^6 células por mililitro; (D) crioconservar las células; (E) descongelar las células; y (f) diluir la solución que contiene las células de 1: 1 a 1: 11 (v/v) con 10% de dextrano-40. Dicha dilución en la etapa (c) puede ser no más de aproximadamente 15×10^6 células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (c) puede ser no más de aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células/ml. Dicha dilución en la etapa (c) puede ser no más de aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células/ml.
- 55 60

La composición que comprende células puede ser realizada mediante un método que comprende: (a) centrifugar una pluralidad de células para recoger las células; (b) resuspender las células en 5,5% de dextrano-40; (c)

centrifugar las células para recoger las células; (d) resuspender las células en una solución de 5,5% de dextrano-40 que comprende 10% de HSA; (e) filtrar las células a través de un filtro de 70 μ M; (f) diluir las células en 5,5% de dextrano-40, 10% de HSA, y 5% de DMSO aproximadamente de 1 a 50 x 10⁶, de 1 a 40 x 10⁶, de 1 a 30 x 10⁶, de 1 a 20 x 10⁶, de 1 a 15 x 10⁶, o de 1 a 10 x 10⁶ células por mililitro; (g) crioconservar las células; (h) descongelar las células; y (i) diluir las células de 1: 1 a 1: 11 (v/v) con 10% de dextrano-40. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) es de no más de aproximadamente 15 x 10⁶ células por mililitro. Dicha dilución en la etapa (f) puede ser de no más de aproximadamente 10 $\pm$ 3 x 10⁶ células/ml. Dicha dilución en la etapa (f) puede ser de no más de aproximadamente 7,5 x 10⁶ células/ml. Si el número de células es menor de aproximadamente 10 $\pm$ 3 x 10⁶ células por mililitro, la filtración puede ser opcional.

- 10 Las composiciones, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden las células placentarias aisladas, que se describen en el presente documento pueden comprender cualquier de las células placentarias aisladas descritas en la presente memoria.

Otras formulaciones inyectables, adecuadas para la administración de productos celulares, pueden ser utilizadas.

- 15 La composición farmacéutica puede comprender células placentarias aisladas que son sustancialmente, o completamente, no de origen materno, es decir, tienen el genotipo fetal; por ejemplo, al menos aproximadamente 90%, 95%, 98%, 99% o aproximadamente 100% son no de origen materno. Por ejemplo, una composición farmacéutica comprende una población de células de la placenta aisladas que son CD200⁺ y HLA-G⁺; CD73⁺, CD105⁺ y CD200⁺; CD200⁺ y OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺; CD73⁺ y CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta que comprende dicha población de células de la placenta aisladas cuando dicha población de células de la placenta se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo tipo embrionario; u OCT-4⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta que comprende dicha población de células de la placenta aisladas cuando dicha población de células de la placenta se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo tipo embrionario; o una combinación de lo anterior, en el que al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de dichas células placentarias aisladas no son de origen materno. Una composición farmacéutica puede comprender una población de células de la placenta aisladas que son CD10⁺, CD105⁺ y CD34⁺; CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ y CD34⁺; CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁺ y al menos uno de CD90⁺ o CD45⁺; CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁺ y CD45⁺; CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁺ y CD45⁺; CD200⁺ y HLA-G⁺; CD73⁺, CD105⁺ y CD200⁺; CD200⁺ y OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺; CD73⁺ y CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta que comprenden dichas células aisladas de la placenta cuando dicha población de células de la placenta se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo tipo embrionario; OCT-4⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo embrionarios en una población de células de la placenta que comprenden dichas células placentarias aisladas cuando dicha población de células de la placenta se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo tipo embrionario; o uno o más de CD117⁺, CD133⁺, KDR⁺, CD80⁺, CD86⁺, HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁺ y/o PDL1⁺; o una combinación de lo anterior, en el que al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de dichas células de la placenta aisladas no son de origen materno. En una realización específica, la composición farmacéutica comprende, además, una célula madre que no se obtiene a partir de una placenta.

- 40 Las células de la placenta aisladas en las composiciones, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento, pueden comprender células derivadas de la placenta de un solo donante o de múltiples donantes. Las células placentarias aisladas pueden ser completamente HLA compatibles respecto a un destinatario, o parcialmente o completamente HLA-coincidentes.

5.7.4 Matrices que comprenden células placentarias aisladas

- 45 Se describen además en este documento composiciones que comprenden matrices, hidrogeles, estructuras, y similares que comprenden una célula de placenta, o una población de células de la placenta aisladas. Tales composiciones se pueden utilizar en lugar de, o además de, células en suspensión líquida.

- 50 Las células placentarias aisladas descritas en este documento pueden ser sembradas en una matriz natural, por ejemplo, un biomaterial de la placenta, tal como un material de la membrana amniótica. Tal material de la membrana amniótica puede ser, por ejemplo, membrana amniótica diseccionada directamente de una placenta de mamíferos; membrana amniótica fijada o tratada térmicamente, membrana amniótica sustancialmente seca (es decir, <20% H₂O), membrana coriónica, membrana coriónica sustancialmente seca, membrana amniótica y coriónica sustancialmente seca, y similares. Los biomateriales preferidos de la placenta en el que las células de la placenta aisladas pueden sembrarse se describen en Hariri, publicación de solicitud de EE.UU. n° 2004/0048796.

- 55 Las células placentarias aisladas descritas en este documento pueden ser suspendidas en una solución de hidrogel adecuada para, por ejemplo, la inyección. Los hidrogeles adecuados para tales composiciones incluyen péptidos de auto-ensamblaje, tales como RAD 16. En una realización, una solución de hidrogel que comprende las células se puede permitir que se endurezca, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tiene células dispersadas en el mismo para la implantación. Las células placentarias aisladas en una matriz de este tipo también pueden ser cultivadas para que las células se expandan mitóticamente antes de la implantación. El hidrogel es, por ejemplo, un

polímero orgánico (natural o sintético) que está reticulado a través de enlaces covalentes, iónicos o enlaces de hidrógeno para crear una estructura de celosía abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Los materiales formadores de hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales de los mismos, péptidos, polifosfazinas, y poliacrilatos, que están reticulados iónicamente, o polímeros de bloques tales como copolímeros de bloque de polietilenglicol-óxido de polipropileno que se reticulan por la temperatura o el pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o la matriz son biodegradables.

La formulación puede comprender un gel polimerizable in situ (véase, por ejemplo, la Solicitud de patente de EE.UU. 2002/0022676; Anseth et al, J. Control Release, 78 (1- 3): 199-209 (2002); Wang et al, Biomateriales, 24 (22): 3969-80 (2003).

Los polímeros pueden ser al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas o soluciones acuosas de alcohol, que tienen cargados grupos laterales, o una sal iónica monovalente de los mismos. Ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que pueden hacerse reaccionar con cationes son poli (fosfacenos), poli (ácidos acrílicos), poli (ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli (acetato de vinilo) y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. Los copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por reacción de monómeros de ácido acrílico o metacrílico y vinil éter o polímeros también se pueden utilizar. Los ejemplos de grupos ácidos son grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos alcohol halogenados (preferiblemente fluorados), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.

La matriz puede ser un fieltro, que puede estar compuesto de un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro utilizando técnicas de procesamiento textil estándar que consisten de engaste, corte, cardado y punción. Las células de la invención se siembran en los estructuras de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Además, la estructura de tres dimensiones se puede moldear en una forma útil, tal como una estructura específica en el cuerpo para ser reparada, sustituida, o aumentada. Otros ejemplos de estructuras que se pueden utilizar incluyen esterillas no tejidas, espumas porosas, o péptidos de autoensamblaje. Las esterillas no tejidas se pueden formar usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (por ejemplo, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero poli (ϵ -caprolactona)/poli (ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por procesos tales como liofilización, o liofilización {véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 6.355.699}, también se pueden utilizar como estructuras.

Las células placentarias aisladas descritas en este documento o los co-cultivos de las mismas se pueden sembrar en un marco tridimensional o estructura e implantarse in vivo. Dicho marco se puede implantar en combinación con cualquier uno o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que, por ejemplo, estimulan la formación de tejido.

Ejemplos de las estructuras que se pueden utilizar incluyen esterillas no tejidas, espumas porosas, o péptidos de autoensamblaje. Las esterillas no tejidas se pueden formar usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (por ejemplo, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero poli (ϵ -caprolactona)/poli (ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por procesos tales como liofilización, o liofilización (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 6.355.699), también se pueden utilizar como estructuras.

En otra realización, las células de la placenta aisladas pueden ser sembradas sobre, o puestas en contacto con un fieltro, que puede estar, por ejemplo, compuesto de un hilo multifilamento de un material bioabsorbible tal como PGA, PLA, copolímeros de PCL o mezclas, o ácido hialurónico.

Las células placentarias aisladas proporcionados en este documento pueden se sembradas en estructuras de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Tales estructuras de espuma se pueden moldear en una forma útil, tal como la de una porción de una estructura específica en el cuerpo a reparar, sustituir o aumentar. El marco puede ser tratado, por ejemplo, con ácido acético 0,1 M seguido de incubación en polilisina, PBS, y/o colágeno, antes de la inoculación de las células con el fin de mejorar la unión celular. Las superficies externas de una matriz pueden ser modificadas para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tales como mediante revestimiento por plasma de la matriz, o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, etc), una matriz celular, y/o otros materiales tales como, pero no limitado a, gelatina, alginatos, agar, agarosa, y gomas vegetales, y similares.

La estructura puede comprender, o ser tratada con los materiales que la hacen no trombogénica. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y mantener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de la matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a los 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™ (Grupo de Tecnología de Polímeros, Inc., Berkeley, California). La estructura puede comprender también agentes anti-trombóticos tales como la heparina;

los estructuras también pueden ser tratadas para alterar la carga superficial (por ejemplo, recubrimiento con plasma) antes de la siembra con células de la placenta aisladas.

Las células de la placenta (por ejemplo, PDAC) proporcionadas en este documento también pueden ser sembradas sobre, o puestas en contacto con un material cerámico fisiológicamente aceptable incluyendo, pero no limitado a, mono-, di-, tri-, alfa- tri-, beta-tri-, y tetra-fosfato de calcio, hidroxiapatita, fluoroapatitos, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de calcio y magnesio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS®, y sus mezclas. Los materiales cerámicos biocompatibles porosos actualmente disponibles en el mercado incluyen Surgibone® (CanMedica Corp., Canadá), Endobon® (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Suiza), y productos de injerto de la mineralización ósea de colágeno tales como HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITOSS®, RHAKOSS™, y CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). El marco puede ser una mezcla o compuesto de materiales naturales y/o sintéticos.

Las células de la placenta aisladas pueden ser sembradas sobre, o puestas en contacto con una estructura adecuada de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ a aproximadamente 8×10^6 células/ml.

5.8 Líneas celulares inmortalizadas placentarias

Las células de la placenta de mamíferos, por ejemplo, PDAC, pueden ser condicionalmente inmortalizadas por transfección con cualquier vector adecuado que contenga un gen promotor del crecimiento, es decir, un gen que codifique una proteína que, en condiciones apropiadas, promueva el crecimiento de la célula transfectada, de manera que la producción y/o la actividad de la proteína que promueve el crecimiento sea regulable por un factor externo. En una realización preferida, el gen promotor del crecimiento es un oncogén tal como, pero no limitado a, v-myc, N-myc, c-myc, p53, el antígeno T grande de SV40, el antígeno T grande de poliovirus, adenovirus Ela o proteína E7 del virus del papiloma humano.

La regulación externa de la proteína promotora del crecimiento se puede lograr colocando el gen promotor del crecimiento bajo el control de un promotor externamente regulable, por ejemplo, un promotor de la actividad de la cual puede ser controlada, por ejemplo, por la modificación de la temperatura de las células transfectadas o la composición del medio en contacto con las células. En una realización, se puede emplear un sistema de expresión génica controlado por tetraciclina (tet) (véase Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 5.547-5.551, 1992; Hoshimaru et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1518-1523, 1996). En ausencia de tet, un transactivador controlado por tet (tTA) dentro de este vector activa fuertemente la transcripción de ph_{CMV}^{-1} , un promotor mínimo de citomegalovirus humano fusionado a secuencias del operador tet. El tTA es una proteína de fusión del represor (tetR) del operón de resistencia de tet derivado de transposón-10 de Escherichia coli y el dominio ácido de VP16 del virus del herpes simplex. Las bajas concentraciones no tóxicas de tet (por ejemplo, 0,01-1,0 mg/ml) casi abolen completamente la transactivación por tTA.

El vector puede contener además un gen que codifica un marcador seleccionable, por ejemplo, una proteína que confiera resistencia a los medicamentos. El gen de resistencia a la neomicina bacteriana (neo^R) es uno de tales marcadores que se pueden emplear dentro de los presentes métodos. Las células que llevan neo^R pueden ser seleccionadas por medios conocidos por los expertos ordinarios en la técnica, tales como la adición de, por ejemplo, 100-200 mg/ml de G418 al medio de crecimiento.

La transfección se puede conseguir por cualquiera de una variedad de medios conocidos por los expertos ordinarios en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, la infección retroviral. En general, un cultivo de células puede transfectarse por incubación con una mezcla de medio condicionado recogido de la línea celular productora para el vector y DMEM/F12 que contiene suplementos de N2. Por ejemplo, un cultivo de células de la placenta preparado como se ha descrito anteriormente puede estar infectado después de, por ejemplo, cinco días in vitro por 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 llevan un marcador de selección pueden ser entonces seleccionadas como se describe anteriormente.

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

Las líneas celulares inmortalizadas condicionalmente placentarias pueden ser pasadas usando técnicas estándar, tales como por tripsinización, cuando sean 80-95% confluentes. Hasta aproximadamente el vigésimo pasaje, es, en algunas realizaciones, beneficioso para mantener la selección (mediante, por ejemplo, la adición de G418 para células que contienen un gen de resistencia a neomicina). Las células también pueden congelarse en nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo.

Las líneas celulares clonales se pueden aislar a partir de una línea de células de placenta humana inmortalizada condicionalmente preparada como se describe anteriormente. En general, tales líneas celulares clonales se pueden aislar usando técnicas estándar, tales como dilución límite o utilizando anillos de clonación y expandirlas. Las líneas celulares clonales pueden generalmente ser alimentadas y pasadas como se describe anteriormente.

Las líneas celulares de placenta humana condicionalmente-inmortalizadas, que pueden, pero no necesitan, ser clonales, pueden generalmente ser inducidas a diferenciarse mediante la supresión de la producción y/o la actividad de la proteína promotora del crecimiento en condiciones de cultivo que faciliten 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, la temperatura o la composición del medio, pueden modificarse para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. Para el sistema de expresión del gen controlado por tetraciclina discutido anteriormente, la diferenciación se puede conseguir mediante la adición de tetraciclina para suprimir la transcripción del gen de la promoción de crecimiento. En general, 1 mg/ml de tetraciclina durante 4-5 días es suficiente para iniciar la diferenciación. Para promover aún más la diferenciación, pueden ser incluidos agentes adicionales en el medio de crecimiento.

5.9 Kits

En otro aspecto, se describen en este documento kits, adecuados para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, que comprenden, en un recipiente separado del contenido del kit restante, células de la placenta multipotentes adherentes de plástico de cultivo de tejido, por ejemplo, células madre de la placenta o células multipotentes placentarias, por ejemplo, las células descritas en la Sección 5.2, más arriba (PDAC), e instrucciones de uso. Preferiblemente, se proporcionan las células de la placenta en una solución farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución adecuada para la administración intralesional o una solución adecuada para la administración intravenosa. Las células madre de la placenta o células multipotentes placentarias pueden ser cualquiera de las células de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺ que se describen en este documento, por ejemplo, células de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ o células de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺.

Los kits pueden comprender uno o más componentes que faciliten la entrega de las células de la placenta a la persona. Por ejemplo, el kit comprende componentes que faciliten la administración intralesional de las células de la placenta a la persona. En tales casos, el kit puede comprender, por ejemplo, jeringas y agujas adecuadas para la administración de las células al individuo, y similares. En tales casos, las células de la placenta pueden estar contenidas en el kit en una bolsa, o en uno o más viales. El kit puede comprender componentes que faciliten la administración intravenosa o intra-arterial de las células de la placenta a la persona. En tales casos, las células de la placenta pueden estar contenidas, por ejemplo, dentro de una botella o bolsa (por ejemplo, una bolsa de sangre o bolsa similar capaz de contener hasta aproximadamente 1,5 l de la solución que comprenda las células), y el kit comprende, además, tubos y agujas adecuados para la administración de las células al individuo.

Además, el kit puede comprender uno o más compuestos que reduzcan el dolor o la inflamación en el individuo (por ejemplo, un analgésico, un compuesto antiinflamatorio esteroide o no esteroide, o similares). El kit también puede comprender un compuesto antibacteriano o antiviral (por ejemplo, uno o más antibióticos), un compuesto para reducir la ansiedad en el individuo (por ejemplo, alprazolam), un compuesto que reduzca una respuesta inmune en el individuo (por ejemplo, ciclosporina A), un antihistamínico (difenhidramina, loratadina, desloratadina, quetiapina, fexofenadina, cetirizina, prometazina, clorfeniramina, levocetirizina, cimetidina, famotidina, ranitidina, nizatidina, roxatidina, lafutidina, o similar).

Además, el kit puede comprender desechables, por ejemplo, toallitas estériles, artículos de papel desechables, guantes, o similares, que faciliten la preparación de la persona para la entrega, o que reduzcan la probabilidad de infecciones en el individuo como resultado de la administración de las células de la placenta.

6. EJEMPLOS

6.1 Ejemplo 1: Caracterización fenotípica de células adherentes derivadas de la placenta

Este ejemplo demuestra la secreción de factores angiogénicos por las células placentarias (células madre de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺, también llamadas PDAC).

6.1.1 Perfiles de secretoma para la evaluación de la potencia angiogénica de células adherentes derivadas de la placenta

Ensayo MultiplexBead: Se sembraron células adherentes derivadas de la placenta en el paso 6 en un número de células iguales en medio de crecimiento y se recogieron los medios condicionados después de 48 horas. El análisis cualitativo simultáneo de múltiples citoquinas angiogénicas/factores de crecimiento en medio acondicionado por células se realizó utilizando ensayos múltiplex basados en perlas magnéticas (Bio-Plex Pro™, Bio-Rad, CA); son ensayos que permiten la medición de biomarcadores angiogénicos en diversas matrices, incluyendo suero, plasma, y sobrenadantes de cultivo de células/tejido. El principio de estos ensayos basados en perlas con formato de placa de 96 pocillos es similar a un inmunoensayo de captura de sandwich. Un anticuerpo dirigido contra el objetivo

5 deseado de la angiogénesis se acopla covalentemente a perlas teñidas internamente. Las perlas acopladas se dejan reaccionar con una muestra que contiene la diana de la angiogénesis. Después de una serie de lavados para eliminar la proteína no unida, se añade un anticuerpo de detección biotinilado específico para un epítipo diferente a la reacción. El resultado es la formación de un sándwich de anticuerpos alrededor del objetivo de la angiogénesis. A continuación se añade estreptavidina-PE que se unen a los anticuerpos de detección biotinilados en la superficie de la perla. En resumen, los ensayos Multiplex se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se evaluó la cantidad de los respectivos factores de crecimiento angiogénicos en los medios acondicionados.

10 ELISA: Análisis cuantitativo de citocinas angiogénicas individuales/factores de crecimiento en el medio condicionado por células se llevó a cabo utilizando kits disponibles comercialmente de R & D Systems (Minneapolis, MN). En breve, los ensayos de ELISA se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se evaluó la cantidad de los respectivos factores de crecimiento angiogénicos en el medio acondicionado.

El nivel de secreción de diversas proteínas angiogénicas por PDAC se muestra en la figura. 1.

Tabla 1 Multiplex y resultados de ELISA para los marcadores angiogénicos

Marcador PDAC	Positivo	Negativo	Secretoma Análisis ELISA, Multiplex
ANG	X		X
EGF	X		X
ENA-78	X		X
FGF2	X		X
Folistatina	X		X
G-CSF	X		X
GRO	X		X
HGF	X		X
IL-6	X		X
IL-8	X		X
Leptina	X		X
MCP-1	X		X
MCP-3	X		X
PDGFB	X		X
PLGF	X		X
Rantes	X		X
TGFB1	X		X
Trombopoyetina	X		X
TIMP1	X		X
TIMP2	X		X
Upar	X		X
VEGF	X		X
VEGFD	X		X

En un experimento separado, se confirmaron que las PDAC secretan también angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, PECAM-1 (CD31; molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas), laminina y fibronectina.

6.2 Ejemplo 2: Caracterización funcional de las células placentarias

5 Este ejemplo demuestra las diferentes características de las células placentarias (células madre de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺, también llamadas PDAC) asociadas con la angiogénesis y la capacidad de diferenciación.

6.2.1 Formación de tubo HUVEC de evaluación de la potencia angiogénica de las PDAC

10 Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se subcultivaron en el paso 3 o menos en medio EGM-2 (Cambrex, East Rutherford, NJ) durante 3 días, y se cosecharon a una confluencia de aproximadamente el 70% - 80%. HUVEC se lavaron una vez con medio basal/antibióticos (DMEM/F12 (Gibco)) y se resuspendieron en el mismo medio a la concentración deseada. HUVEC se utiliza dentro de 1 hora de preparación. Se llevó colágeno placentario humano (HPC) a una concentración de 1,5 mg/ml en HCl 10 mM (pH 2,25), se neutralizó con tampón a pH 7,2, y se mantuvo en hielo hasta su uso. El HPC se combinó con la suspensión de HUVEC a una concentración final de células de 4.000 células/μl. La suspensión resultante HUVEC/HPC se pipetea inmediatamente en placas de 15 96 pocillos a 3 μl por pozo (el perímetro de la placa debe ser pre-llenados con PBS estéril para evitar la evaporación, n = 5 por condición). Se incubaron gotas HUVEC a 37°C y 5% CO₂ durante 75-90 minutos sin adición de medio para permitir la polimerización del colágeno. Al término de la incubación en "seco", cada pocillo se llenó con cuidado con 200 μl de medio de PDAC condicionado (n = 2 líneas celulares) o medio de control (por ejemplo, DMEM/F12 como control negativo, y EGM-2 como control positivo) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 20 h. El medio 20 acondicionado se preparó incubando PDAC en el paso 6 en medio de crecimiento durante 4 - 6 horas; después de la fijación y la difusión, el medio se cambió a DMEM/F12 durante 24 horas. Después de la incubación, el medio se eliminó de los pocillos sin molestar a las gotas de HUVEC y los pocillos se lavaron una vez con PBS. Las gotas HUVEC fueron fijadas durante 10 segundos y se tiñeron durante 1 minuto usando un kit de tinción celular Diff-Quik y 25 posteriormente se enjuagaron 3 x veces con agua estéril. Las gotas teñidas se dejaron secar al aire y las imágenes de cada pocillo fueron adquiridas mediante el microscopio Zeiss STEREO Discovery V8. Las imágenes fueron analizadas utilizando el paquete de software ImageJ y/o MatLab. Las imágenes se convierten de color a escala de grises de 8 bits y los umbrales se convierten a una imagen en blanco y negro. A continuación, la imagen se analizó 30 utilizando las funciones de análisis de partículas, que proporcionaron datos de densidad de píxeles, incluyendo el recuento (número de partículas individuales), superficie total, tamaño medio (de las partículas individuales), y la fracción de área, lo que equivale a la cantidad formación del tubo endotelial en el ensayo.

El medio acondicionado ejerce un efecto angiogénico en las células endoteliales, como se ha demostrado por la inducción de la formación del tubo (véase la Fig. 2).

6.2.2 Ensayo de migración de HUVEC

35 Este experimento demostró la capacidad angiogénica de las células adherentes derivadas de la placenta. Las HUVEC se cultivaron a confluencia en una monocapa de fibronectina (FN) recubiertas con placa de 12 pocillos y la monocapa fue "rayada" con una punta de pipeta de plástico de 1 ml para crear una línea acelular a través del pocillo. La migración HUVEC se ensayó mediante la incubación de las células "rayadas" con medio condicionado libre de suero (EBM2; Cambrex) obtenido de PDAC después de 3 días de crecimiento. El medio EBM2 sin células se utilizó como control. Después de 15 horas, se registró la migración de las células en la zona acelular (n = 3) usando un 40 microscopio invertido. Las imágenes fueron analizadas mediante el paquete de software de ordenador imageJ y/o MatLab. Las imágenes se convierten de color a escala de grises de 8 bits y el umbral convierte una imagen en blanco y negro. A continuación, la imagen se analizó utilizando las funciones de análisis de partículas, que proporcionaron datos de densidad de píxeles, incluyendo recuento (número de partículas individuales), superficie total, tamaño medio (de las partículas individuales), y la fracción de área, lo que equivale a la cantidad de la migración endotelial en el ensayo. El grado de migración celular se marcó ante el tamaño de la línea de la rayadura 45 registrada inicialmente y los resultados se normalizaron a 1 X 10⁶ células.

Los factores tróficos secretados por las células adherentes derivadas de la placenta ejercen efectos sobre las células endoteliales angiogénicas, como se ha demostrado por la inducción de la migración de células (Fig. 3).

50 En un experimento separado, se cultivaron HUVECs en la parte inferior de placas de 24 pocillos para el establecimiento durante la noche en EGM2, seguido de una inanición de medio día en EBM. Al mismo tiempo, las PDAC cultivadas en medios se descongelaron y se cultivaron en cultivos polarizados (8 μM) durante la noche. Después de la inanición EC, el DMEM libre de suero acondicionado, junto con el cultivo polarizado, se transfirió a la ECs para la proliferación durante la noche. 4 repeticiones se incluyeron en cada experimento, y la proliferación después de 24 horas se evaluó con el ensayo Cell Titer Glo de Promega. Se utilizó medio EBM-2 como el control 55 negativo, y se utilizó EGM-2 como control positivo. Las barras de error indican las desviaciones estándar de repeticiones de análisis (n = 3).

Los factores tróficos secretados por PDAC resultaron en un aumento en el número de células HUVEC, lo que es indicativo de la proliferación de HUVEC. Véase la figura. 4.

6.2.3. Formación de tubos para la evaluación de potencia angiogénica de las células adherentes derivadas de la placenta

Las PDAC se cultivaron en medio de crecimiento, ya sea sin VEGF o EGM2-MV con VEGF para evaluar la potencia angiogénica de las células en general, así como el efecto de VEGF en el potencial de diferenciación de las células. Se cultivaron HUVEC, como células de control para la formación de tubos, en EGM2-MV. Las células se cultivaron en los medios respectivos de 4 a 7 días hasta que alcanzaron de 70 a 80% de confluencia. Se dispuso una solución de MATRIGEL™ fría (4°C) (50 µL; BD Biosciences) en los pocillos de una placa de 12 pocillos y la placa se incubó durante 60 min a 37°C para permitir que la solución gelificara. Las células PDAC y HUVEC se tripsinizaron, se resuspendieron en el medio adecuado (con y sin VEGF) y 100 µl de células diluidas (de 1 a 3 x 10⁴ células) se añadieron a cada uno de los pocillos con MATRIGEL™. Las células en el MATRIGEL™ polimerizado, en presencia o ausencia de 0,5 a 100 ng de VEGF, se colocaron durante 4 a 24 horas en un incubador de CO₂ al 5% a 37°C. Después de la incubación las células fueron evaluadas para detectar signos de formación de tubos mediante microscopía de luz estándar.

Las PDAC muestran la formación de tubos mínima en ausencia de VEGF, pero se indujeron/diferenciaron para formar estructuras similares a tubos a través de la estimulación con VEGF. Véase la figura. 5.

6.2.4 Capacidad de respuesta frente a la hipoxia para la evaluación de la potencia angiogénica de células adherentes derivadas de la placenta

Para evaluar la funcionalidad angiogénica de las células endoteliales y/o los progenitores endoteliales, las células se pueden evaluar en cuanto a su capacidad para secretar factores de crecimiento angiogénicos bajo condiciones hipóxicas y de normoxia. Los cultivos en condiciones de hipoxia generalmente inducen un aumento de la secreción de factores de crecimiento angiogénicos por cualquiera de las células endoteliales o células progenitoras endoteliales, que se puede medir en el medio acondicionado. Las células adherentes derivadas de la placenta se sembraron en número de células iguales en su medio de crecimiento estándar y se dejaron crecer hasta aproximadamente el 70-80% de confluencia. Posteriormente, se cambiaron las células a medio libre de suero (EBM-2) y se incubaron en condiciones de normoxia (21% O₂) o hipóxicas (1% O₂) durante 24 h. Se recogieron los medios condicionados y la secreción de los factores de crecimiento angiogénicos fue analizada mediante kits de ELISA disponibles comercialmente de R & D Systems. Los ensayos de ELISA se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la cantidad de los respectivos factores de crecimiento angiogénicos (VEGF e IL-8) en el medio acondicionado se normalizó a 1 x 10⁶ células.

Las células adherentes derivadas de la placenta muestran elevada secreción de varios factores de crecimiento angiogénicos en condiciones hipóxicas. Véase la figura. 6.

6.2.5 Respuesta HUVEC frente al medio acondicionado-PDAC

Se cultivaron PDAC durante 48 horas en medio de crecimiento que contenía 60% de DMEM-LG (Gibco); 40% de MCB201 (Sigma); 2% de FBS (Hyclone Labs), 1 x insulina-transferrina-selenio (ITS); 10 ng/ml de ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); 1 n-dexametasona (Sigma); ácido ascórbico 2-fosfato 100 µM (Sigma); 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (R & D Systems); y 10 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (R & D Systems), y después se cultivaron durante 48 horas adicionales en medios libres de suero. Se recogió el medio condicionado del cultivo PDAC y se usó para estimular HUVEC privado de suero durante 5, 15, y 30 minutos. Las HUVEC se lisaron y se tiñeron posteriormente con un Kit de señalización Flex de células BD™ CBA (BD Biosciences) (Ensayo de bolas citométrico) para las fosfoproteínas conocidas porque desempeñan un papel en la señalización de la vía angiogénica. Se encontró que las PDAC eran fuertes activadores de AKT-1 (que inhibe los procesos de apoptosis), AKT-2 (que es una proteína de señalización importante en la vía de señalización de la insulina, y vías de proliferación de células ERK ½ en HUVECs. Estos resultados demuestran además la capacidad angiogénica de las PDAC.

6.3 Ejemplo 3: inducción de la angiogénesis por PDAC

Este Ejemplo demuestra que las PDAC, como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente, promueven la angiogénesis en un ensayo in vivo utilizando la membrana corioalantoidea de pollo (CAM).

Se realizaron dos ensayos separados CAM. En el primer ensayo CAM, se evaluaron sedimentos de células intactas de diferentes preparaciones de PDAC. En el segundo ensayo de CAM, se evaluaron los sobrenadantes de diferentes preparaciones PDAC. El factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) se utilizó como control positivo, y se usaron células MDA-MB-231 de cáncer de mama humanas como referencia, el vehículo y los controles de medio como controles negativos. El punto final del estudio fue determinar las densidades de los vasos sanguíneos de todos los grupos de tratamiento y control.

6.3.1 Ensayo CAM utilizando PDAC

Las PDAC, preparadas como se describen arriba y criopreservadas, se utilizaron. Las PDAC se descongelaron para la dosificación y se determinó el número de células dosificadas en la CAM.

Diseño del estudio: El estudio incluyó a 5 grupos con 10 embriones en cada grupo. El diseño del estudio se describe en la Tabla 2.

Tabla 2: Grupos de estudio, ensayo de angiogénesis de membrana corioalantoidea de pollo.

No. de Grupo	No. de embriones	Tratamiento	Punto Final
1	10	Control del vehículo (40 µl de mezcla de PBS/Matrigel™, 1: 1 en volumen)	Puntuación de densidad de vasos sanguíneos
2	10	Control positivo, tratado con bFGF (100 ng/CAM en 40 µl de mezcla de DMEM/MATRIGEL™, 1:1)	Igual que el grupo 1
3	10	Control de medio (40 µl de DMEM)	Igual que el grupo 1
4	10	PDAC	Igual que el grupo 1
5	10	células MDA-MB-231 P34, Lote No. 092608	Igual que el grupo 1

- 5 Procedimiento del ensayo CAM: Fueron incubados huevos fértiles frescos durante 3 días en una incubadora de huevos estándar a 37°C durante 3 días. En el día 3, los huevos estaban agrietados en condiciones estériles y los embriones se colocaron en veinte placas de 100 mm de plástico y se cultivaron a 37°C en una incubadora de embriones con un depósito de agua en el estante inferior. Se burbujeó aire de forma continua en el depósito de agua utilizando una pequeña bomba de modo que la humedad en la incubadora se mantuvo constante. En el día 6, un anillo de silicona estéril "O" se colocó en cada CAM, y luego PDAC a una densidad de $7,69 \times 10^5$ células/40 µl de mezcla de medio/Matrigel™ (1:1) se dieron en cada anillo "O" en una campana estéril. Las Tablas 2A y 2B representan el número de células utilizadas y la cantidad de medio añadida a cada preparación de células para la dosificación. Los embriones de control del vehículo recibieron 40 µl del vehículo (PBS/Matrigel™, 1:1), los controles positivos recibieron 100 ng/ml de bFGF/en 40 µl de mezcla de medio DMEM/Matrigel™ (1:1), y los controles de medio recibieron 40 µl de medio DMEM solo. Los embriones se devolvieron a la incubadora después de que se completara cada dosificación. En el día 8, los embriones fueron retirados de la incubadora y se mantuvieron a temperatura ambiente mientras que se determinó la densidad de los vasos sanguíneos debajo de cada anillo "O" por medio de la captura de una imagen del sistema con un aumento de 100 X.

- 20 La densidad de los vasos sanguíneos se midió mediante un sistema de puntuación de la angiogénesis que utiliza números aritméticos de 0 a 5, o números exponenciales de 1 a 32, para indicar el número de vasos sanguíneos presentes en los sitios de tratamiento en la CAM. Los números más altos de puntuación representaron la densidad más alta de los vasos, mientras que 0 representaba ninguna angiogénesis. El porcentaje de inhibición en cada sitio de dosificación se calculó usando la puntuación registrada para ese sitio dividido por la puntuación media obtenida a partir de muestras de control para cada experimento individual. El porcentaje de inhibición para cada dosis de un compuesto dado se calculó mediante la agrupación de todos los resultados obtenidos para esa dosis de 8-10 embriones.

Tabla 3: Cantidad de medio añadido a cada preparación de células para la normalización de la suspensión celular final para la dosificación

Línea celular	Tamaño de peletes	Normalización con DMEM y Matrigel™	Volumen final de la suspensión de células
PDAC	260 µl	0 µl + 260 µl de Matrigel™	520 µl
MDA-MB-231	40 µl	220 µl + 260 µl de Matrigel™	520 µl

Las PDAC se utilizaron en el Paso 6.

30 Resultados

- 35 Los resultados de las puntuaciones de la densidad de los vasos sanguíneos se presentan en la figura 7. Los resultados indican claramente que las puntuaciones de la densidad de los vasos sanguíneos de las membranas corioalantoideas de los pollos tratados con suspensiones PDAC de células, o 100 ng/NIL de bFGF, o suspensiones de células de cáncer de mama MDAMB231 fueron estadísticamente significativamente mayores en comparación a los de las CAM de control de vehículo ($p < 0,001$, ensayo de "t" Student). El medio utilizado para las PDAC de cultivo (control negativo) no tuvo ningún efecto sobre la densidad de los vasos sanguíneos. Además, la inducción de la

densidad de los vasos sanguíneos de los preparados PDAC mostró alguna variación, pero las variaciones no fueron estadísticamente significativas.

6.3.2 Ensayo CAM utilizando sobrenadantes PDAC

- 5 Se utilizaron muestras de sobrenadante de células MDA-MB-231 y PDAC en un segundo ensayo de CAM como se describe anteriormente. Se utilizaron los sobrenadantes de bFGF y MDA-MB-231 como controles positivos, medio y vehículo se utilizaron como controles negativos.

Diseño del estudio: El estudio incluyó a 5 grupos con 10 embriones en cada grupo. El diseño del estudio se describe en la Tabla 4.

Tabla 4: Estudio de Diseño - Ensayo de CAM utilizando sobrenadantes celulares

No. de Grupo	No. de embriones	Tratamiento	Punto Final
1	10	Control del vehículo (40 µl de mezcla de PBS/Matrigel™, 1: 1 en volumen)	Puntuación de densidad de vasos sanguíneos
2	10	Control positivo, tratado con bFGF (100 ng/CAM en 40 µl de mezcla de DMEM/MATRIGEL™, 1:1)	Igual que el grupo 1
3	10	Control de medio (40 µl de DMEM)	Igual que el grupo 1
4	10	Sobrenadante de PDAC	Igual que el grupo 1
5	10	Sobrenadante de células MDAMB231 (P34)	Igual que el grupo 1

- 10 Los sobrenadantes PDAC se obtuvieron a partir de las células en el Paso 6.

Procedimiento del ensayo CAM: El procedimiento de ensayo fue el mismo que se describe en la sección 6.3.1, más arriba. La única diferencia fue que el sobrenadante de cada preparación de células madre o de células MDA-MB-231 se usó como material de prueba. Para la dosificación, cada sobrenadante se mezcló con MATRIGEL™ (1:1 en volumen) y 40 µl de la mezcla se dosificó a cada embrión.

- 15 Resultados: las puntuaciones de la densidad de los vasos sanguíneos (véase Fig. 8) indican que la inducción de la formación de vasos sanguíneos por el sobrenadante de cada preparación de células madre fue diferente. Las muestras de sobrenadante de PDAC mostraron un efecto significativo sobre la inducción de vasos sanguíneos con $P < 0,01$, $P < 0,001$ y $P < 0,02$ (prueba "t" de Student), respectivamente. Como era de esperar, el control positivo bFGF también mostró una potente inducción de la formación de vasos sanguíneos como se ha visto anteriormente en el ensayo de CAM no. 1 ($P < 0,001$, prueba de la "t" de Student). Sin embargo, el sobrenadante de las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 no mostraron inducción significativa en la formación de vasos sanguíneos en comparación con los controles del vehículo. Como se muestra anteriormente, el medio de cultivo por sí solo no tiene ningún efecto.

6.4 Ejemplo 4: Las PDAC exhiben efecto neuroprotector

- 25 Este ejemplo demuestra que las PDAC tienen un efecto neuroprotector con bajos niveles de oxígeno y bajas condiciones de glucosa usando un ensayo de estimulación de privación de oxígeno-glucosa (OGD), y reducen las especies reactivas del oxígeno. Como tal, estos resultados indican que las PDAC serían útiles en el tratamiento de condiciones isquémicas tales como accidentes cerebrovasculares o enfermedad vascular periférica, y protegería contra lesiones por reperfusión que resultan de condiciones de isquemia.
- 30 Se cultivaron neuronas humanas (Sciencell, catálogo n°. 1520) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se recubrieron recipientes de cultivo con poli-L-lisina (2µg/ml) en agua destilada estéril durante 1 hora a 37°C. El recipiente se lavó con H₂O bidestilada tres veces. Se añadió Medio neurona (Sciencell) al recipiente y se equilibró a 37°C en una incubadora. Las neuronas se descongelaron, y se añadieron directamente en los vasos sin centrifugación. Durante el posterior cultivo, el medio se cambió al día siguiente del inicio del cultivo, y cada dos días a partir de entonces. Las neuronas estaban típicamente listas para la estimulación hacia el día 4.

- 35 Se preparó medio OGD (Medio Eagle Modificado de Dulbecco-sin glucosa) calentando primero el medio en un baño de agua, en parte para reducir la solubilidad del oxígeno en el medio líquido. Se burbujeó 100% de nitrógeno durante 30 minutos a través del medio utilizando una piedra de difusión de 0.5µm para eliminar el oxígeno disuelto. Se añadió tampón HEPES a una concentración final de 1 mM. El medio se añade directamente a las neuronas en el extremo del burbujeo. Una pequeña muestra del medio se dividió en alícuotas para la confirmación de los niveles de oxígeno utilizando un sensor de oxígeno de tipo inmersión. Los niveles de oxígeno se redujeron típicamente a de 0,9% a aproximadamente 5,0% de oxígeno.

Una cámara de hipoxia se preparó colocando la cámara en una incubadora a 37°C durante al menos 4 horas (toda la noche preferida) antes de la formación de gases. El medio en los recipientes de cultivo se retiró y se reemplazó con medio desgasificado, y los recipientes de cultivo se colocaron en la cámara de hipoxia. A continuación, la cámara de hipoxia se lavó abundantemente con gas CO₂ 95%/N₂ 5% a través del sistema a una velocidad de 20 a 25 Lpm durante al menos 5 minutos. El sistema se incubó en la incubadora a 37°C durante 4 horas, con desgasificación de la cámara una vez más después de 1 hora.

Al final del procedimiento de estimulación, el medio OGD se aspiró y se añadió medio caliente para las neuronas. 24-28 horas más tarde, las PDAC y las neuronas se sembraron en un número igual a 100.000 células cada uno por pocillo de una placa de 6 pocillos suspendida en Medio Neuronal, se añadieron a las neuronas y co-cultivaron durante 6 días.

Las fotomicrografías se tomaron de campos aleatorios en una placa de 6 pocillos para cada condición. Se identificaron las células que tenían una morfología típica de las neuronas, y se registraron las longitudes de las neuritas. La longitud media de las neuritas se correlacionó positivamente con la salud neuronal, y fue más larga en co-cultivos de neuronas y PDAC, lo que indica que las PDAC estaban protegiendo a las células de la estimulación.

Ensayo de especies reactivas de oxígeno

Las PDAC se determinaron que expresaban la superóxido dismutasa, catalasa, y el gen de la hemo oxigenasa durante la hipoxia. La capacidad de las PDAC para secuestrar las especies reactivas del oxígeno, y para proteger las células de dichas especies se determinó en un ensayo usando peróxido de hidrógeno como un generador de especies de oxígeno reactivo.

Descripción del Ensayo: Se sembraron células diana (astrocitos, Sciencell Research Laboratories) en placas de pocillos de 96 pocillos negras pre-recubiertas con poli-L-lisina a 6000/cm². Los astrocitos se dejaron que se unieran durante la noche en medio de crecimiento a 37°C con dióxido de carbono 5%. El día siguiente, el medio de cultivo se retiró y las células se incubaron con colorante permeable a células DCFH-DA (diacetato de diclorofluorescina), que es una sonda fluorogénica. El colorante en exceso se eliminó por lavado con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco o solución salina tamponada de Hank. Las células fueron luego estimuladas con especies reactivas de oxígeno por adición de peróxido de hidrógeno 1,000 µM durante 30-60 minutos. El medio que contenía peróxido de hidrógeno después se retiró, y se sustituyó con medio de crecimiento sin glucosa y sin suero. Se añadieron las PDAC a 6.000/cm², y las células se cultivaron durante otras 24 horas. Las células después se leyeron en un lector de placas de fluorescencia estándar a 480Ex y 530Em. El contenido de especies reactivas de oxígeno del medio era directamente proporcional a los niveles de DCFH-DA en el citosol celular. El contenido de las especies reactivas de oxígeno se mide por comparación con la curva estándar DCF pre-determinada. Todos los experimentos se realizaron con N = 24.

Para el ensayo, se preparó IX DCFH-DA inmediatamente antes de su uso diluyendo una solución madre 20 X DCFH-DA a 1X en medios de cultivo celular sin suero bovino fetal, y agitando hasta la homogeneidad. Se prepararon diluciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en DMEM o DPBS cuando fue necesario. Una curva estándar se preparó como una serie de dilución 1: 10 en el intervalo de concentración de 0 µM a 10 µM diluyendo DCF estándar 1 mM en medio de cultivo celular, transfiriendo 100 µl de DCF estándar a una placa de 96 pocillos adecuada para la medición de fluorescencia, y añadiendo 100 µl de tampón de lisis de células. La fluorescencia se leyó a 480Ex y 530Em.

Resultados: Las PDAC redujeron significativamente la concentración de especies reactivas de oxígeno en los co-cultivos de astrocitos. Véase la figura 9.

6.5 Ejemplo 5: Métodos de tratamiento usando células madre de la placenta

6.5.1 Tratamiento de infarto de miocardio

Un individuo varón de unos 50 años se presenta con dolor en el pecho que se irradia al brazo izquierdo durante más de 20 minutos, falta de aliento, náuseas, palpitaciones, sudoración. Con los resultados del electrocardiograma y un ascenso y caída de los niveles sanguíneos de creatina quinasa, se hace un diagnóstico diferencial de infarto de miocardio (transmural) de la pared anterior del corazón. Después de la estabilización de la persona con nitroglicerina y estreptoquinasa, se administra al individuo de 1 x 10⁸ a 5 x 10⁸ de células madre de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ (PDAC) en 0,9% de solución salina directamente a la zona afectada usando una jeringa cardiaca con anestesia local. El individuo se controla con carácter de emergencia durante las siguientes 72 horas. El individuo se controla aún más en los próximos tres meses después del tratamiento mediante electrocardiogramas y/o técnicas de visualización por tintes para evaluar el grado de revascularización de la zona infartada. La eficacia terapéutica se establece si los resultados del electrocardiograma están discerniblemente más cerca de lo normal que antes de la administración de las PDAC, o si el área infartada, según se visualiza, se ha revascularizado discerniblemente.

6.5.2 Tratamiento de la miocardiopatía

Un individuo se presenta con dificultad para respirar, hinchazón de las piernas y tobillos, y latidos irregulares del corazón. Después de excluir otras causas, y con una confirmación por electrocardiograma, se le hace un diagnóstico de miocardiopatía. Una ecografía confirma que el individuo tiene miocardiopatía congestiva. Se le administra al individuo de 1×10^8 a 5×10^8 células madre de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ en 0,9% de solución salina directamente a la arteria cardíaca utilizando una jeringa cardíaca con anestesia local. El individuo se supervisa durante los siguientes tres meses para analizar los cambios en las lecturas del sonograma que indican un mayor flujo normal de la sangre, y para la mejora en la sensación de falta de aire y la reducción de la hinchazón de las piernas y los tobillos. La eficacia terapéutica se establece para el individuo si alguno de estos signos muestran una mejoría durante el período de seguimiento.

6.5.3 Tratamiento de la enfermedad vascular periférica

Un individuo se presenta con pies fríos y hormigueo, que se ponen de color rojo al dejarlos colgados, y dolor, debilidad y cansancio en las piernas. Después de excluir diabetes, se hace un diagnóstico de enfermedad arterial periférica. Se le administra al individuo de 1×10^9 a 5×10^9 de células madre de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ por vía intravenosa en 450 ml de solución salina 0,9%, y se monitoriza cada dos semanas durante los siguientes tres meses. La eficacia terapéutica se establece si alguno de los síntomas descritos anteriormente mejora durante el período de seguimiento.

6.5.4 Tratamiento de enfermedad vascular periférica

Un individuo se presenta con pies fríos y hormigueo, que se ponen de color rojo al dejarlos colgados, y dolor, debilidad y cansancio en las piernas. Después de excluir la diabetes, se hace un diagnóstico de enfermedad arterial periférica. Se administra al individuo de 1×10^8 a 5×10^8 de células madre de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ por vía intramuscular en 5 ml de 0,9% de solución salina, y/o una cantidad equivalente por vía intravenosa o intraarterial, localmente entre los dedos de los pies, y se controla cada dos semanas durante los siguientes tres meses. La eficacia terapéutica se establece si alguno de los síntomas descritos anteriormente mejora durante el período de seguimiento.

6.5.5 Tratamiento combinado de enfermedad vascular periférica

Un individuo se presenta con los pies fríos y hormigueo, que se ponen de color rojo al dejarlos colgados, y dolor, debilidad y cansancio en las piernas. Después de excluir la diabetes, se hace un diagnóstico de enfermedad arterial periférica. Se le administra al individuo de 1×10^9 a 5×10^9 de células madre de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ por vía intravenosa en 450 ml de solución salina al 0,9%, y se monitoriza cada dos semanas durante los siguientes tres meses. Al individuo también se le prescribe cilostazol, 100 mg, que se toma dos veces al día. La eficacia terapéutica se establece si alguno de los síntomas descritos anteriormente mejora durante el período de seguimiento.

6.5.6 Terapia combinada de enfermedad vascular periférica

Un individuo se presenta con el pie derecho frío, hormigueo, que se vuelve rojo al colgarlo, y dolor, debilidad y cansancio en la pierna derecha. Después de excluir la diabetes, se hace un diagnóstico de enfermedad arterial periférica. Al individuo se le administra angioplastia individual, y cirugía para implantar una endoprótesis en la arteria femoral. Al individuo se le administra posteriormente de 1×10^9 a 5×10^9 de células madre de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ por vía intravenosa en 450 ml de solución salina al 0,9%, y se controla cada dos semanas durante los próximos tres meses. La eficacia terapéutica se establece si alguno de los síntomas descritos anteriormente mejora durante el período de seguimiento.

6.5.7 Tratamiento de accidente cardiovascular utilizando PDAC

Un varón de 52 años se presenta con hemiplejía en el lado izquierdo del cuerpo y afasia parcial. Se hace un diagnóstico de accidente cardiovascular isquémico. Después de localizar el área de la isquemia usando imágenes de resonancia magnética, el individuo se prepara para la cirugía para crear una abertura en el cráneo en el lado afectado. Una vez realizada la apertura, de 5×10^7 de 1×10^8 células madre de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ en 1-2 ml de solución salina 0,9% se administran a la zona isquémica. El individuo es monitoreado durante los próximos 7-14 días para observar los signos de mejora en cualquiera de los síntomas del accidente cardiovascular, sobre todo hemiplejía o afasia. La eficacia terapéutica se establece si alguno de los síntomas descritos anteriormente mejora durante el período de seguimiento.

6.5.8 Tratamiento de accidente cardiovascular utilizando PDAC

5 Un varón de 52 años se presenta con hemiplegia en el lado izquierdo del cuerpo y afasia parcial. Se hace un diagnóstico de accidente cardiovascular isquémico. Después de localizar el área de la isquemia usando imágenes de resonancia magnética, el individuo se prepara para la cirugía para crear una abertura en el cráneo en el lado afectado. Una vez realizada la abertura, de 1×10^9 a 5×10^9 de células madre de la placenta CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ en 450 ml de solución 0,9% de solución salina se administran por vía intravenosa . El individuo es
10 monitoreado durante los próximos 7-14 días para observar los signos de mejora en cualquiera de los síntomas del accidente cardiovascular, sobre todo hemiplegia o afasia. La eficacia terapéutica se establece si alguno de los síntomas descritos anteriormente mejora durante el período de seguimiento.

REIVINDICACIONES

1. Una población de células adherentes derivadas de la placenta que son CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, y CD200⁺, como se determina por citometría de flujo, para su uso en un método para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, en donde dicha enfermedad o trastorno del sistema circulatorio es la enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, úlcera diabética o isquemia crítica periférica.
2. La población de las células adherentes derivadas de la placenta para su uso de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad o trastorno del sistema circulatorio es una enfermedad vascular periférica.
3. La población de las células adherentes derivadas de la placenta para su uso de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad o trastorno del sistema circulatorio es una enfermedad arterial periférica.
4. La población de las células adherentes derivadas de la placenta para su uso de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad o trastorno del sistema circulatorio es una isquemia crítica periférica.
5. La población de las células adherentes derivadas de la placenta para su uso de la reivindicación 2, en donde dichos síntomas de dicha enfermedad vascular periférica son pies fríos y hormigueo, que se ponen de color rojo al dejarlos colgados, dolor, o debilidad y cansancio en las piernas.
6. La población de las células adherentes derivadas de la placenta para su uso de la reivindicación 4, en donde dichos síntomas de dicha isquemia crítica periférica son dolor de reposo isquémico; dolor severo en las piernas y pies mientras el individuo no está en movimiento; llagas que no sanan en los pies o las piernas; dolor o entumecimiento en los pies; piel brillante, suave, seca de las piernas o pies; engrosamiento de las uñas de los pies; pulso ausente o bajo en las piernas o los pies; llagas abiertas; infecciones de la piel o úlceras que no sanan; o gangrena seca de las piernas o los pies.
7. La población de las células adherentes derivadas de la placenta para su uso de la reivindicación 1, en donde dichas células adherentes derivadas de la placenta son además una o más de CD45⁺, o CD90⁺, como se detecta por citometría de flujo.
8. La población de las células adherentes derivadas de la placenta para su uso de la reivindicación 1, en donde dichas células adherentes derivadas de la placenta son además OCT-4⁺, como se detecta por RT-PCR.
9. La población de las células adherentes derivadas de la placenta para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dichas células adherentes derivadas de la placenta se administran intravenosamente, intraarterialmente, intramuscularmente, intradérmicamente, o subcutáneamente.
10. La población de las células adherentes derivadas de la placenta para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde se administran aproximadamente 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , o 1×10^{10} de dichas células adherentes derivadas de la placenta.

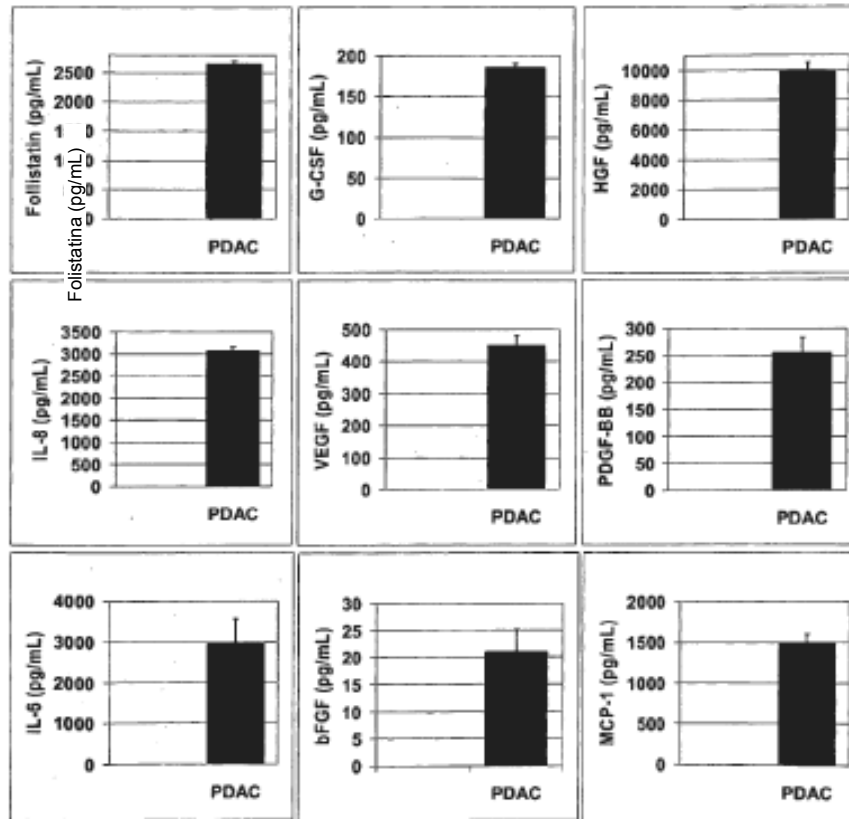


FIG. 1

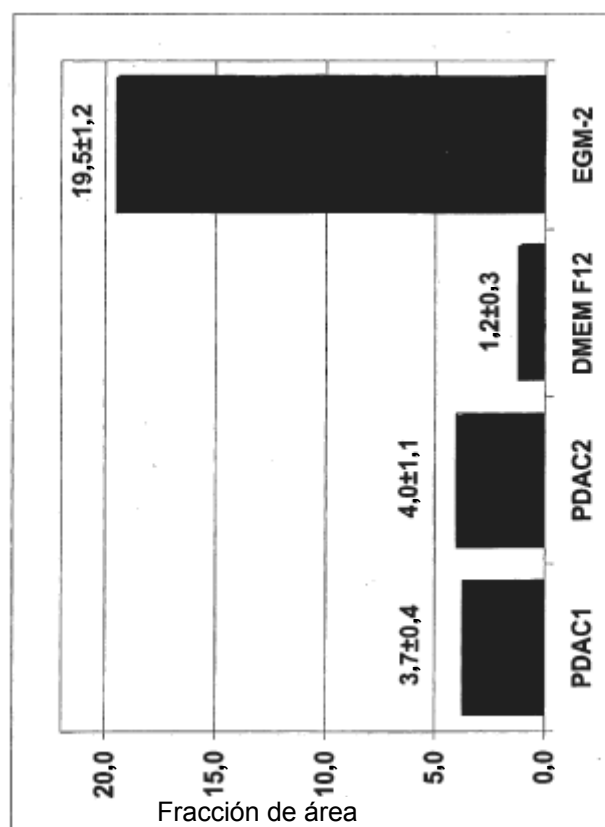


FIG. 2

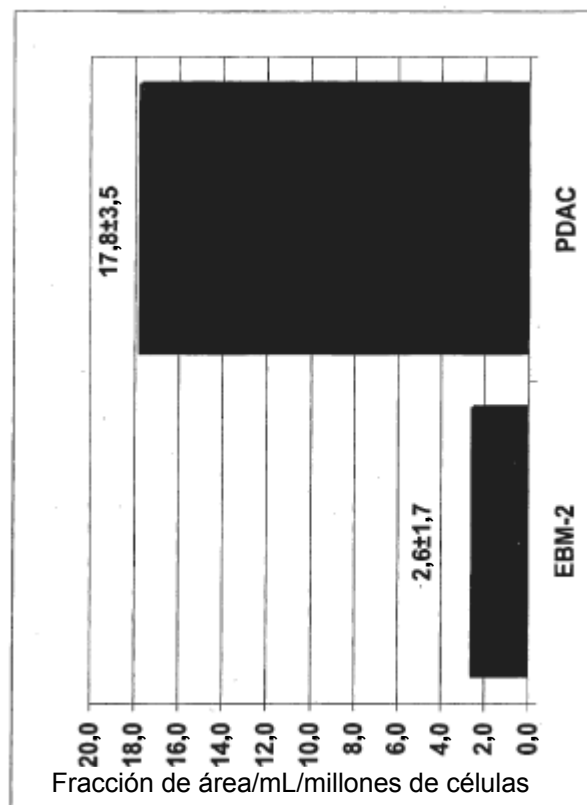


FIG. 3

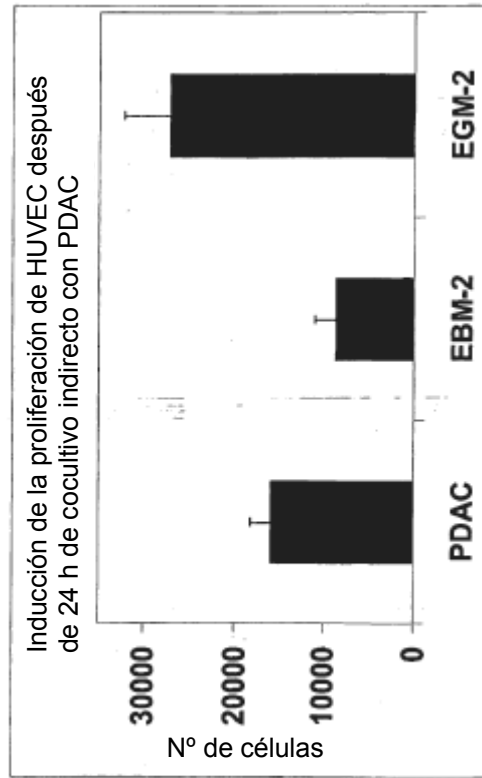


FIG. 4

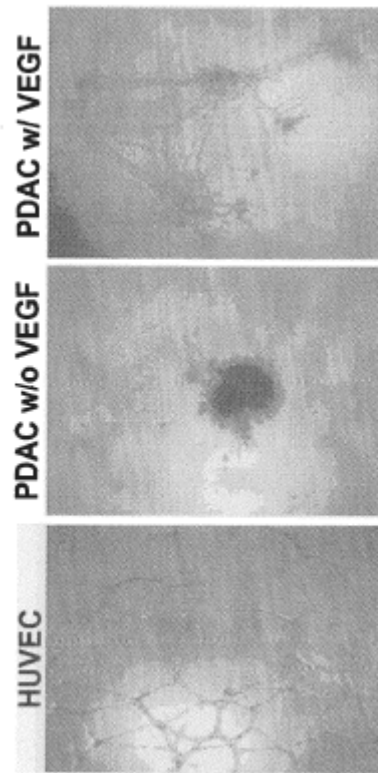


FIG. 5

Perfil de secreción de hipoxia de PDAC

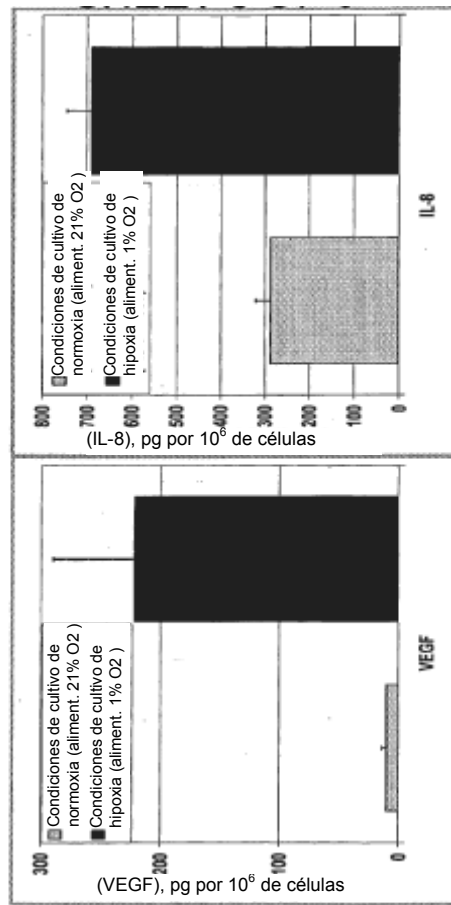


FIG. 6

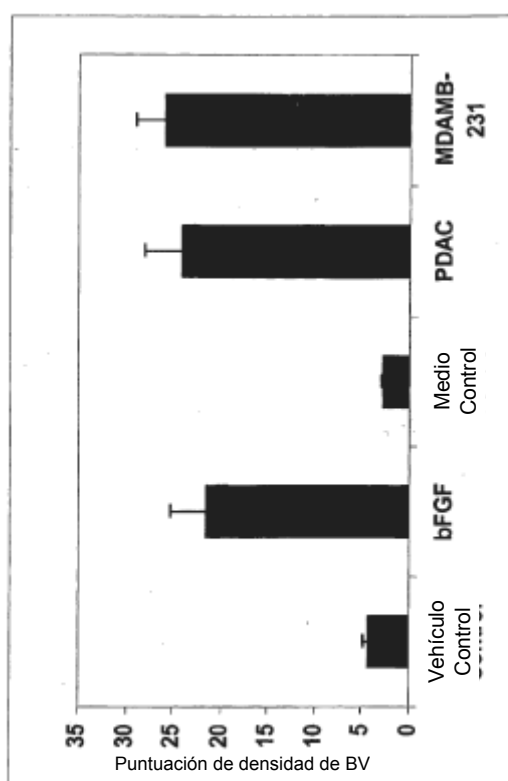


FIG. 7

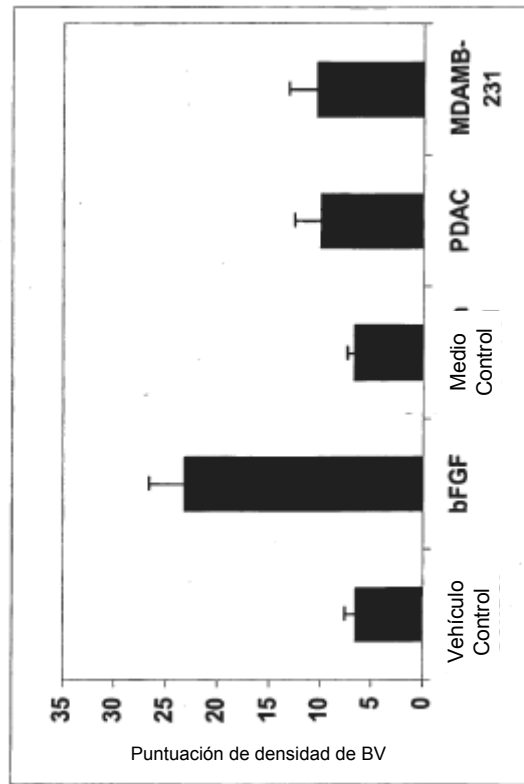


FIG. 8

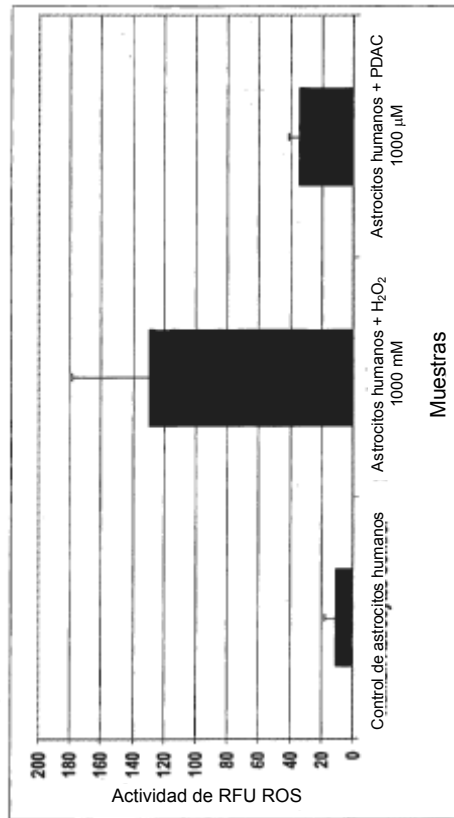


FIG. 9