

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 469**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2009 PCT/US2009/004740**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO10021714**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2009 E 09789172 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2330889**

54 Título: **Composición celular mejorada y métodos de elaboración de la misma**

30 Prioridad:

**20.08.2008 US 90577 P**

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

**17.05.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZEITLIN, ANDY;  
RUSSOTTI, GREGORY;  
HE, SHUYANG;  
PAL, AJAI;  
CHEN, HONG, J.;  
BRIEVA, THOMAS;  
SHORR, RYAN y  
MURPHY, BRIAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 612 469 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

Composición celular mejorada y métodos de elaboración de la misma

### 1. Campo

5 Se proporcionan en la presente memoria procedimientos para la elaboración de composiciones mejoradas, p. ej., composiciones farmacéuticas, que comprenden células de mamíferos, p. ej., células madre y células de la placenta, tales como células pluripotentes placentarias adherentes humanas aisladas, p. ej., células pluripotentes de la placenta descritas en la sección 5.3, o células aisladas de líquido perfundido de la placenta, p. ej., células nucleadas totales aisladas de líquido perfundido de la placenta.

### 2. Antecedentes

10 Las composiciones de células, p. ej., las composiciones de células madre, se han convertido en una terapia atractiva para una serie de deficiencias fisiológicas, p. ej., la sustitución de la médula ósea. Existe una necesidad de formulaciones de células mejoradas, p. ej., células madre, que se van a administrar a individuos que necesitan tales composiciones.

### 3. Compendio

15 La presente memoria proporciona métodos mejorados de preparación de composiciones que comprenden células de mamífero, p. ej., células de la placenta aisladas, tales como las células madre de la placenta, células pluripotentes de la placenta, células de la placenta que pueden ser expandidas y tienen el potencial de diferenciarse en al menos dos tipos de células diferentes, p. ej., células de tipo osteogénico y condrogénico o células aisladas de líquido perfundido de la placenta, p. ej., células nucleadas totales aisladas de líquido perfundido de la placenta, y composiciones que comprenden tales células, p. ej., que son adecuadas para la administración a un individuo. Los métodos mejorados utilizan etapas específicas y composiciones específicas para el tratamiento de pre-crioconservación, crioconservación y descongelación de las células. En ciertas realizaciones, los métodos mejorados reducen o eliminan la formación de cúmulos después de la descongelación de las células crioconservadas. En realizaciones preferidas, las composiciones mejoradas comprenden células pluripotentes de la placenta.

25 Por lo tanto, específicamente, la presente invención proporciona un método de elaboración de una composición que comprende células de mamífero, que comprende:

(a) poner en contacto dichas células con una solución que comprende (1) dextrano, maltodextrano, trehalosa o hetalmidón; y (2) albúmina de suero humano (HSA) para formar una solución que contiene células;

(b) filtrar la solución que contiene las células a través de un filtro de 70 micrómetros a 100 micrómetros;

30 (c) si dicha solución que contiene células comprende más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, diluir dichas células a no más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro con una primera solución de dilución que comprende dextrano.

35 En una realización del método de la presente invención, dichas células son crioconservadas tras la etapa (c). En otra realización, dicha solución en la etapa (a) comprende HSA al 10% (p/v). En otra realización de la invención, dicha primera dilución comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v). En una realización adicional más, dicha primera solución de dilución comprende HSA al 10% (p/v). En otra realización, dicha solución en la etapa (a) o dicha primera solución de dilución comprenden adicionalmente un crioprotector, preferiblemente en donde dicho crioprotector en dicha primera solución de dilución es DMSO. En una realización adicional, el método de la presente invención comprende después de la etapa (c), la etapa (d) de dilución de la solución que contiene células con una segunda solución de dilución que comprende dextrano, maltodextrano, trehalosa o hetalmidón pero no comprende HSA, elaborando de ese modo una composición que comprende células de mamíferos. En otra realización, dicha segunda solución de dilución comprende dextrano 40 al 5,5% o al 10% (p/v). En una realización, dicho filtro es un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros. En una realización específica, dichas células de mamífero son células de la placenta adherentes humanas aisladas.

45 En una realización, el método de la presente invención comprende:

(a) suspender una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas en una solución de dextrano 40 al 5,5% (p/v), albúmina de suero humano al 10% (p/v) (HSA) para formar una solución que contiene células;

50 (b) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros;

(c) diluir la solución que contiene células en dextrano 40 al 5,5% (p/v), HSA al 10% (p/v), y DMSO al 5% a no más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro;

(d) crioconservar las células;

(e) descongelar las células; y

(f) diluir opcionalmente la solución que contiene las células 1:1 a 1:11 con dextrano 40 al 10% (p/v) para producir dicha composición.

5 En una realización adicional, el método de la presente invención comprende:

(a) centrifugar una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas para recoger las células;

(b) resuspender las células en dextrano 40 al 5,5% (p/v);

(c) centrifugar las células para recoger las células;

10 (d) resuspender las células en una solución de dextrano 40 al 5,5% (p/v) que comprende albúmina de suero humano al 10% (HSA) (p/v) para formar una solución que contiene células;

(e) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros;

(f) diluir la solución que contiene las células en dextrano 40 al 5,5% (p/v), HSA al 10% (p/v), y DMSO al 5% a no más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro;

(g) crioconservar las células;

15 (h) descongelar las células; y

(i) opcionalmente, diluir la solución que contiene las células 1:1 a 1:11 con dextrano 40 al 10% (p/v) para producir dicha composición.

En una realización adicional más, el método de la presente invención comprende:

20 (a) proporcionar una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas en una solución que comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v) y albúmina de suero humano al 10% (HSA) (p/v) para formar una solución que comprende células de la placenta adherentes humanas aisladas;

(b) filtrar dicha solución que comprende células de la placenta adherentes humanas aisladas a través de un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros para producir células de la placenta adherentes humanas aisladas filtradas;

25 (c) diluir dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas filtradas con una cantidad de una solución que comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v), HSA al 10% (p/v) y dimetilsulfóxido al 5% (DMSO) suficiente para llevar dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas filtradas a  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro; y

30 (d) diluir dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas con dextrano 40 al 10% (p/v) a una razón de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:11 células de la placenta adherentes humanas aisladas:dextrano 40 para producir dicha composición.

En otra realización, el método de la presente invención comprende:

(a) poner en contacto células de la placenta adherentes humanas aisladas con una solución que comprende dextrano al 5,5% (p/v) y albúmina de suero humano al 10% (HSA) (p/v);

35 (b) filtrar las células de la placenta adherentes humanas aisladas a través de un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros; y

(c) diluir dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas a  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro con una solución que comprende dextrano 40 al 10% (p/v),

40 en donde dicha composición no comprende macro-cúmulos de células, en donde el macro-cúmulo de células comprende una agregación de células mayor de aproximadamente 150 micrómetros.

En una realización del método de la presente invención, dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas son células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup>; preferiblemente dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup> son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En una realización adicional, dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> o CD90<sup>+</sup>. En una realización adicional más, dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>.

45 La presente invención también se refiere a una composición obtenible mediante los métodos de la presente invención. En una realización, la composición de la presente invención comprende una pluralidad de células de la

placenta adherentes humanas aisladas en una solución que comprende dextrano 40 al 4-10% (p/v), en donde dicha composición comprende entre  $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$  células por mililitro y  $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$  células por mililitro, y en donde dicha composición no comprende macro-cúmulos de células, en donde un macro-cúmulo de células comprende una agregación de células mayor de aproximadamente 150 micrómetros. En otra realización, la composición de la presente invención comprende menos de aproximadamente 100 micro-cúmulos de células por  $10^6$  células. En una realización adicional de la composición de la presente invención, las células de la placenta adherentes humanas aisladas son células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup>; preferiblemente dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup> son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En una realización adicional de la composición de la presente invención, dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> o CD90<sup>+</sup>. En una realización adicional más de la composición de la presente invención, dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>.

En una realización, se proporciona en la presente memoria un método para elaborar una composición que comprende: (a) poner en contacto las células con una solución que comprende dextrano y albúmina de suero humano (HSA) para formar una solución que contiene células; (b) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70  $\mu$ M a 100  $\mu$ M para formar una solución que contiene células filtradas; (c) opcionalmente, diluir la solución que contiene las células filtradas a aproximadamente 1, a  $10 \times 10^6$  células por mililitro con una primera solución de dilución que comprende dextrano; y (d) opcionalmente, diluir la solución que contiene las células filtradas con una segunda solución de dilución que comprende dextrano. En algunas realizaciones, la etapa (c) se realiza cuando la solución que contiene las células filtradas en (b) comprende más de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (c) es de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En realizaciones particulares, la etapa (c) se realiza cuando la solución que contiene las células filtradas en (b) comprende más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (c) tiene aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En algunas realizaciones, la etapa (c) se realiza cuando la solución que contiene las células filtradas en (b) comprende más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (c) es hasta aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro. La solución que comprende dextrano de la etapa (d) no comprende albúmina de suero humano. En una realización específica, las células de la composición que contiene las células filtradas se crioconservan antes de la etapa (d).

En algunas realizaciones, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución es dextrano al 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%. En algunas realizaciones, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución es dextrano a aproximadamente 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20%. El dextrano en la primera solución de dilución o segunda solución de dilución puede ser dextrano de cualquier peso molecular, p. ej., dextrano que tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 150 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 125 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 75 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 50 kDa, o de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 25 kDa. En algunas realizaciones, el dextrano en la primera solución de dilución o segunda solución de dilución tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 10 kDa, de aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 50 kDa, o de aproximadamente 60 kDa a aproximadamente 80 kDa. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano 1. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución y dicha segunda solución de dilución es dextrano 1. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano 70. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución y dicha segunda solución de dilución es dextrano 70. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano 40. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano 40 de 2,5% a 10%. En algunas realizaciones, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución es dextrano 40 a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%. En algunas realizaciones, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución es dextrano 40 a aproximadamente 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20%. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 al 5,0%. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 al 5,5%. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha segunda solución de dilución es dextrano 40 al 10%.

En otras realizaciones, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución pueden comprender un polisacárido además de o distinto, es decir, en lugar de, dextrano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución comprenden maltodextrano (p. ej., maltodextrina a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), trehalosa (p. ej., trehalosa a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), o hetalmidón (p. ej., hetalmidón a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%,

4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25 %, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%). En otras realizaciones, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución comprenden sacarosa (p. ej., sacarosa a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), heparina (p. ej., heparina de 55 unidades USP/ml), o glucógeno (p. ej., glucógeno a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%). En una realización particular, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución comprenden maltodextrano además de o distinto, es decir, en lugar de, dextrano. En otra realización particular, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución comprenden trehalosa además de o distinta, es decir, en lugar de, dextrano. En otra realización particular, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución comprenden hetalmidón además de o distinto, es decir, en lugar de, dextrano.

En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA de aproximadamente 1 a 17%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% o 17%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA de aproximadamente 4 a 10%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA a aproximadamente 3,125%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA a aproximadamente 5%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA a aproximadamente 10%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA a aproximadamente 16,875%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA de aproximadamente 1 a 17%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% o 17%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA de 4 a 10%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA a aproximadamente 3,125%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA a aproximadamente 5%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA a aproximadamente 10%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera dilución es HSA a aproximadamente 16,875%.

En otras realizaciones, se puede utilizar albúmina de suero bovino (BSA) (p. ej., BSA a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%) o de suero bovino fetal (FBS) (p. ej., FBS a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%) adicionalmente de HSA en dicha solución.

En algunas realizaciones, la razón de HSA con respecto a dextrano, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70, en la primera solución está entre HSA:dextrano aproximadamente 6:1 y HSA:dextrano aproximadamente 1:2,6. En algunas realizaciones, la razón de HSA con respecto a dextrano es de HSA:dextrano de aproximadamente 6:1, 5,5:1, 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2,0:1, 1,5:1, 1:1, 1:1,5, 1:2 ó 1:2,6. En algunas realizaciones, la razón de HSA con respecto a dextrano, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70, en la primera solución es de aproximadamente HSA al 3,13%/dextrano al 8,25%. En algunas realizaciones, la razón de HSA con respecto a dextrano, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70, en la primera solución es de aproximadamente HSA al 16,88%/dextrano al 2,75%. En realizaciones concretas, la razón de HSA con respecto a dextrano, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70, en la primera solución es de aproximadamente HSA al 10%/dextrano al 5,5%, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70.

En otra realización específica, dicha solución en la etapa (a) o una solución que contiene células comprende un crioprotector. En una realización más específica, dicho crioprotector es dimetilsulfóxido (DMSO). En una realización particular, la solución expuesta en la etapa (a) comprende DMSO de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% o de aproximadamente 10% a aproximadamente 15%. En una realización particular, la solución expuesta en la etapa (a) comprende DMSO a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%. En una realización particular, la solución expuesta en la etapa (a) comprende DMSO a aproximadamente 5%. En otra realización específica, dicha primera solución de dilución comprende adicionalmente un crioprotector. En una realización más específica, dicho crioprotector es dimetilsulfóxido (DMSO). En una realización particular, dicha primera solución de dilución comprende adicionalmente DMSO de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% o de aproximadamente 10% a aproximadamente 15%. En una realización particular, dicha primera solución de dilución comprende adicionalmente DMSO a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%. En una realización particular, dicha primera solución de dilución comprende adicionalmente DMSO a aproximadamente 5%.

En una realización específica, dicha primera solución de dilución comprende dextrano 40 a aproximadamente 5,5%, HSA a aproximadamente 10%, y DMSO a aproximadamente 5%.

En una realización particular, el método de la invención produce una composición que comprende de  $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$  a  $50 \pm 1,5 \times 10^6$  células por mililitro y dextrano a aproximadamente 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, o 9,0%, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70. En general, dicho procedimiento produce una composición que comprende células y dextrano de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9%, por ejemplo, dextrano 40. En otra realización específica, dicho método produce una composición que comprende de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células por mililitro a aproximadamente  $3,75 \times 10^6$  células por mililitro. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, el método produce una composición que comprende 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. En otras realizaciones específicas, el método produce una composición que comprende entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células por mililitro y  $6,5 \times 10^6$  células por mililitro, p. ej., entre aproximadamente  $1,3 \times 10^6$  células por mililitro y aproximadamente  $6,5 \times 10^6$  células por mililitro. En otra realización específica, dicho método produce una composición que comprende HSA de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%. En otra realización específica, dicho método produce una composición que comprende HSA a aproximadamente 1% a HSA a aproximadamente 10%.

Además se proporciona en la presente memoria un método de elaboración de una composición, que comprende: (a) filtrar una pluralidad de células en una solución que comprende dextrano 40 al 5,5% y HSA al 10% a través de un filtro de 70  $\mu\text{M}$  - 100  $\mu\text{M}$  para formar una solución que contiene células filtradas; (b) si dicha solución que contiene células comprende más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro diluir la solución que contiene células filtradas con dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10%, y DMSO al 5% a aproximadamente  $1$  a  $10 \times 10^6$  células por mililitro; (c) crioconservar las células; (d) descongelar las células; y (e) diluir la solución que contiene células filtradas con dextrano 40 al 10% para producir dicha composición. En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza cuando la solución que contiene células filtradas en (a) comprende más de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (b) es a aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza cuando la solución que contiene células filtradas en (a) comprende más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (b) es de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza cuando la solución que contiene células filtradas en (a) comprende más de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (b) es de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro. En algunas realizaciones, la etapa (e) comprende diluir la solución que contiene células filtradas de 1:1 a 1:5 (v/v) con dextrano 40 al 10%. En algunas realizaciones, la etapa (e) comprende diluir la solución que contiene células filtradas de 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano 40 al 10%. En una realización más específica, la solución que contiene células de la etapa (a) comprende, adicionalmente, un crioprotector, p. ej., DMSO, p. ej., DMSO de aproximadamente 2% a aproximadamente 15%. En una realización particular, la solución expuesta en la etapa (a) comprende, adicionalmente, DMSO a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%. En una realización particular, la solución expuesta en la etapa (a) comprende, adicionalmente, DMSO a aproximadamente 5%. En el método de la invención, el filtro en la etapa (a) es un filtro 70  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ .

En otra realización, se proporciona en la presente memoria un método de elaboración de una composición, que comprende: (a) centrifugar una pluralidad de células para recoger las células; (b) resuspender las células en dextrano 40 al 5,5%; (c) centrifugar las células para recoger las células; (d) resuspender las células en una solución de dextrano 40 al 5,5% que comprende HSA al 10% para producir una solución que contiene células; (e) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  para producir una solución que contiene células filtradas; (f) si dicha solución que contiene células comprende más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, diluir la solución que contiene células filtradas en dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10%, y un crioprotector, p. ej., DMSO, p. ej., DMSO al 5% a aproximadamente  $1$  a  $10 \times 10^6$  células por mililitro; (g) crioconservar las células; (h) descongelar las células; e (i) diluir la solución que contiene las células de 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano 40 al 10% para producir dicha composición. En algunas realizaciones, la etapa (f) se realiza cuando la solución que contiene células filtradas en (e) comprende más de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (f) es de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En realizaciones particulares, la etapa (f) se realiza cuando la solución que contiene células filtradas en (e) comprende más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dilución en la etapa (f) es de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En algunas realizaciones, la etapa (e) se lleva a cabo cuando la solución que contiene células filtradas en (e) comprende más de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (f) es de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro. Asimismo, en una realización particular, si la resuspensión expuesta en la etapa (d) diera como resultado una solución que contuviera células que comprendiera menos de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, la solución expuesta en la etapa (d) comprendería un crioprotector, p. ej., DMSO, p. ej., DMSO de aproximadamente 2% a aproximadamente 15%. En el método de la invención, el filtro en la etapa (e) es un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ .

También se proporciona en la presente memoria un método de elaboración de una composición, que comprende: (a) filtrar una solución que comprende células de la placenta aisladas, dextrano 40 al 5,5% y albúmina de suero humano al 10% (HSA) con un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  que elimina cúmulos de células visibles para producir una solución que contiene células de la placenta aisladas filtradas; (b) diluir dicha dilución que contiene células de placenta aisladas filtradas con una cantidad de una solución que comprende dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10% y dimetilsulfóxido al 5% (DMSO) suficiente para llevar dicha solución que contiene células de la placenta aisladas filtradas a aproximadamente  $1$  a  $10 \times 10^6$  células por mililitro; y (c) diluir dicha solución que contiene células de la

placenta aisladas filtradas con dextrano 40 al 10% para producir dicha composición. En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza cuando la solución que contiene células filtradas en (a) comprende más de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (b) es de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En realizaciones particulares, la etapa (b) se realiza cuando la solución que contiene células filtradas en (a) comprende más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (b) es de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza cuando la solución que contiene células filtradas en (a) comprende más de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (b) es de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro. En algunas realizaciones, la etapa (c) comprende diluir dicha solución que contiene células de la placenta aisladas filtradas con dextrano 40 al 10% a una razón de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:11 de solución que contiene células de la placenta aisladas: dextrano 40 (v/v). En algunas realizaciones, la etapa (c) comprende diluir dicha solución que contiene células de la placenta aisladas filtradas con dextrano 40 al 10% a una razón de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:5 de solución que contiene células de la placenta aisladas:dextrano 40 (v/v). En una realización específica, dicho filtro es un filtro de 70  $\mu\text{M}$ . En otra realización específica, dicho filtro es un filtro de 100  $\mu\text{M}$ . En el método de la invención, el filtro en la etapa (a) es un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ .

En una realización específica de cualquiera de los métodos anteriores, la composición es una composición farmacéutica.

En otra realización específica de cualquiera de los métodos anteriores, el método comprende adicionalmente la concentración de la composición de células resultante a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células por mililitro a  $1 \times 10^8$  células por mililitro. Tal composición es útil, por ejemplo, para la administración subcutánea de la composición a un individuo que lo necesite.

En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas que comprenden células, p. ej., células madre, células de la placenta aisladas, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, obtenidas por medio de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. En una realización, se proporciona en la presente memoria una composición, p. ej., una solución, que comprende una pluralidad de células, p. ej., células madre, células de la placenta aisladas, por ejemplo, células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, en donde dicha composición comprende entre 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, y en donde dicha composición no comprende cúmulos visibles de células (es decir, no hay macro-cúmulos de células), o sustancialmente ninguno de tales cúmulos visibles. En otras ciertas realizaciones, la composición comprende entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células por mililitro y  $6,5 \times 10^6$  células por mililitro, p. ej., entre aproximadamente  $1,3 \times 10^6$  células por mililitro y aproximadamente  $6,5 \times 10^6$  células por mililitro.

En algunas realizaciones, las composiciones anteriores comprenden dextrano a aproximadamente 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70. En una realización específica, dicha composición comprende dextrano 40 de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9%. En una realización específica, dicha composición comprende dextrano 40 a aproximadamente 5,5%.

En otras realizaciones, dicha composición comprende un polisacárido además de o distinto de, es decir, en lugar de, dextrano. En ciertas realizaciones, el polisacárido es un polímero de glucosa que no comprende subunidades de sacárido distintas de glucosa. En otras realizaciones, dicha composición comprende maltodextrina (p. ej., maltodextrina a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), trehalosa (p. ej., trehalosa a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), o hetalmidón (p. ej., hetalmidón a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), o heparina (p. ej., heparina de 55 USP/ml), o glucógeno (p. ej., glucógeno a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%). En una realización particular, dicha composición comprende maltodextrano además de o distinto de, es decir, en lugar de, dextrano. En otra realización particular, dicha composición comprende trehalosa además de o en lugar de dextrano. En otra realización particular, dicha composición comprende hetalmidón además de o en lugar de dextrano.

En otra realización específica, dicha composición comprende HSA de aproximadamente 1% a aproximadamente 17%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende HSA a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, o aproximadamente 17%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende HSA a aproximadamente 3,125%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende HSA a aproximadamente 5%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende HSA a aproximadamente

10%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende HSA a aproximadamente 16,875%.

En otras realizaciones, dicha composición comprende albúmina de suero bovino (BSA) (p. ej., BSA a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%) o suero bovino fetal (FBS) (p. ej., FBS a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%), adicionalmente de HSA.

En algunas realizaciones, dicha composición comprende un crioprotector, p. ej., DMSO, p. ej., DMSO de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende DMSO de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende DMSO de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% o de aproximadamente 10% a aproximadamente 15%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende DMSO a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%. En una realización particular, la composición comprende DMSO a aproximadamente 5%.

En una realización específica, dichas células han sido crioprotectadas y descongeladas. De acuerdo con la invención, dichas células se han filtrado a través de un filtro de 70  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ . En otra realización específica, dicha composición no comprende macro-cúmulos de células, en donde los macro-cúmulos de células comprenden una agregación de células mayor de aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ . En otra realización específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 200 cúmulos de células por cada  $10^6$  células, en donde dichos cúmulos de células sólo son visibles bajo un microscopio, p. ej., un microscopio óptico. En otra realización específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 150 cúmulos de células por cada  $10^6$  células, en donde dichos cúmulos de células sólo son visibles bajo un microscopio, p. ej., un microscopio óptico. En otra realización específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 100 cúmulos de células por cada  $10^6$  células, en donde dichos cúmulos de células sólo son visibles bajo un microscopio, p. ej., un microscopio óptico.

En una realización específica de cualquiera de los métodos o composiciones descritos en la presente memoria, las células son células madre, por ejemplo, células madre aisladas de una placenta después del parto humano cuya sangre ha sido drenada. En ciertas realizaciones, se han ampliado tales células. En otra realización específica de cualquiera de las realizaciones anteriores, las células son células adherentes, es decir, las células que se adhieren a la superficie del cultivo de tejidos, p. ej., el plástico del cultivo de tejido (ya sea sin recubrir o recubierto, p. ej., con fibronectina, laminina, o similar). Los ejemplos de células adherentes incluyen, p. ej., las células madre adherentes de la placenta, como se describe en la presente memoria; células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, fibroblastos, o similares. En otra realización, las células son células humanas.

En otra realización, dichas células son células obtenidas a partir de (p. ej., aisladas de) líquido perfundido de placenta. En una realización más específica, dichas células son células nucleadas, p. ej., células nucleadas totales, obtenidas a partir de líquido perfundido de placenta. En ciertas realizaciones, se drena la sangre de la placenta de la que se obtienen por perfusión células de la placenta nucleadas totales y se perfunden para eliminar la sangre residual antes de la perfusión para recoger las células de la placenta nucleadas totales. En ciertas realizaciones, se drena la sangre de la placenta de la que se obtienen por perfusión células de la placenta nucleadas totales pero no se perfunde para eliminar la sangre residual antes de la perfusión para recoger células de la placenta nucleadas totales. En otras ciertas realizaciones, ni se drena la sangre de la placenta de la que se obtienen las células de la placenta nucleadas totales, ni se perfunde para eliminar la sangre residual antes de la perfusión para recoger las células de la placenta nucleadas totales. En otras ciertas realizaciones, ni se drena la sangre de la placenta de la que se obtienen las células de la placenta nucleadas totales por perfusión ni se perfunde para eliminar la sangre residual antes de la perfusión para recoger las células de la placenta nucleadas totales.

En otra realización específica del método, dichas células son células madre. En realizaciones más específicas, las células madre son células madre adultas, células madre somáticas, células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre de cordón umbilical, células madre de líquido amniótico, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de la sangre de cordón, células madre mesenquimales derivadas de sangre periférica, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo o células madre mesenquimales derivadas de periostio. En otra realización, dichas células son células asesinas naturales.

En otra realización específica, dichas células son células de la placenta aisladas. En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son células madre de la placenta aisladas. En otras ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son células pluripotentes de la placenta aisladas.

En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son células madre de la placenta aisladas. En otras ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son células pluripotentes placentarias aisladas. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son  $\text{CD}34^+$ ,  $\text{CD}10^+$  y  $\text{CD}105^+$  según se detecta por citometría de flujo. En una realización más específica, las células de la placenta aisladas  $\text{CD}34^+$ ,  $\text{CD}10^+$ ,  $\text{CD}105^+$  son células madre de la placenta. En otra realización más específica, las células de la placenta  $\text{CD}34^+$ ,  $\text{CD}10^+$ ,  $\text{CD}105^+$  aisladas son células de la placenta pluripotentes. En otra realización específica, las células de la placenta  $\text{CD}34^+$ ,

CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo neural, células de un fenotipo osteogénico, o células de un fenotipo condrogénico. En una realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En otra realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son adicionalmente CD90<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>, según se detecta por citometría de flujo. En otra realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son adicionalmente CD90<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>, según se detecta por citometría de flujo. En una realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> son adicionalmente CD90<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>, según se detecta por citometría de flujo. En otra realización más específica, las células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> son, adicionalmente, CD90<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>, según se detecta por citometría de flujo. En otra realización más específica, las células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> son, adicionalmente, CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>, según se detecta por citometría de flujo.

En una realización más específica, las células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> son, adicionalmente, uno o más de CD29<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> o SH4<sup>+</sup>. En otra realización más específica, las células son adicionalmente CD44<sup>+</sup>. En otra realización específica de cualquiera de las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas anteriores, las células son, adicionalmente, una o más de CD117<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP, DQ, DR<sup>-</sup>, y/o ligando de muerte programada-1 (PDL1)<sup>+</sup>.

En otras realizaciones, las células de la placenta aisladas son CD200<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>; CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprende dichas células de la placenta aisladas cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embriode; u OCT-4<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta, que comprende las células de la placenta aisladas cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode; o cualquier combinación de las mismas. En una realización específica, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>.

En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son uno o más de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, MHC-I<sup>+</sup>, KDR (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP, DQ, DR<sup>-</sup>, PDL1<sup>+</sup> o ABC-p<sup>+</sup>, donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de la placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)). En una realización específica, las células de la placenta aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, y SH4<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, HLA-1<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup> y ABC-p<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, y SSEA4<sup>-</sup>. En una realización específica, dichas células OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, y SSEA4<sup>-</sup> son, adicionalmente, CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, y SH4<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup>, y SH3<sup>+</sup> o SH4<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son CD34<sup>-</sup> y, CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, u OCT-4<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>.

En otra realización, las células de la placenta aisladas útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son uno o más de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>-</sup>, CD62-E<sup>-</sup>, CD62-L<sup>-</sup>, CD62-P<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD104<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD144/VE-cadherina<sup>baja</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, β2-microglobulina<sup>baja</sup>, MHC-I<sup>baja</sup>, MHC-II<sup>-</sup>, HLA-G<sup>baja</sup>, y/o PDL1<sup>baja</sup>. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son al menos CD29<sup>+</sup> y CD54<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son, al menos, CD44<sup>+</sup> y CD106<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son al menos CD29<sup>+</sup>.

En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas expresan uno o más genes a un nivel detectable mayor que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde 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 donde dichas células madre mesenquimales derivadas de médula ósea han sido sometidas a numerosos pases en cultivo equivalentes al número de pases al que se han sometido dichas células de la placenta aisladas. En una realización más específica, dichas células de la placenta aisladas expresan dichos uno o más genes cuando se

5 cultivan durante aproximadamente 3 a aproximadamente 35 duplicaciones de la población en un medio que comprende Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)-LG al 60% (preferiblemente de Gibco) y MCDB-201 al 40% (preferiblemente de Sigma); suero de ternera fetal al 2% (preferiblemente de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1X ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona  $10^{-9}$  M (preferiblemente de Sigma); ácido ascórbico - 2-fosfato  $10^{-4}$  M (preferiblemente de Sigma); factor de crecimiento epidérmico de 10 ng/ml (preferiblemente de R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (preferiblemente de R & D Systems). En una realización más específica, dichas células de la placenta aisladas expresan dichos uno o más genes cuando se cultivan durante aproximadamente 3 a aproximadamente 35 duplicaciones de la población en un medio que comprende DMEM-LG al 60% (preferiblemente de Gibco) y MCDB-201 al 40% (preferiblemente de Sigma); suero de ternera fetal al 2% (preferiblemente de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico - albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona  $10^{-9}$  M (preferiblemente de Sigma); ácido ascórbico - 2-fosfato  $10^{-4}$  M (preferiblemente de Sigma); factor de crecimiento epidérmico de 10 ng/ml (preferentemente de R & D Systems); y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) de 10 ng/ml (preferiblemente de R & D Systems).

15 En otra realización específica, dichas células madre de la placenta expresan factores de crecimiento neurotróficos (GDNF) derivados de células gliales, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento placentario (PGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

20 En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas están contenidas dentro de una población de células, de las cuales al menos 50% son dichas células de la placenta aisladas. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas están contenidas dentro de una población de células, de las cuales al menos 70% son dichas células de la placenta aisladas. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas están contenidas dentro de una población de células, de las cuales al menos 80% son dichas células de la placenta aisladas. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas están contenidas dentro de una población de células, de las cuales al menos 90% son dichas células de la placenta aisladas. En otras ciertas realizaciones, las células de la placenta en dicha población de células están sustancialmente libres de células que tienen un genotipo materno; p. ej., 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 tienen un genotipo fetal, es decir, son de origen fetal. En otras ciertas realizaciones, la población de células que comprende dichas células de la placenta están sustancialmente libres de células que tienen un genotipo materno; p. ej., al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicha población tiene un genotipo fetal, es decir, son de origen fetal.

30 En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son células de la placenta  $CD34^+$ , p. ej., células hematopoyéticas de la placenta. Tales células se pueden obtener a partir de tejido de la placenta, p. ej., a partir de una placenta cuya sangre del cordón se ha drenado y se ha perfundido para eliminar la sangre residual. En ciertas realizaciones, las células de la placenta  $CD34^+$  son  $CD38^+$ . En ciertas realizaciones, las células de la placenta  $CD34^+$  son  $CD38^-$ . En otras ciertas realizaciones, las células de la placenta  $CD34^+$  son  $CD45^+$ . En una realización específica, las células de la placenta son  $CD34^+$ ,  $CD38^-$  y  $CD45^+$ .

35 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, p. ej., durante la proliferación en medio de crecimiento. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas no requieren una capa de alimentación para proliferar. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas no se diferencian en el cultivo como el resultado del cultivo en ausencia de una capa de células de alimentación.

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

45 En ciertas realizaciones del método anterior, las células de la placenta aisladas se filtran y se crioconservan como parte de la construcción de un banco de células de la placenta. Por ejemplo, las células de la placenta aisladas se aíslan a partir de una placenta, o tejido de la placenta, y después del cultivo, se resuspenden en una solución que comprende, p. ej., dextrano, p. ej., dextrano 40, p. ej., dextrano 40 al 5,5%. En realizaciones más específicas, la solución comprende adicionalmente HSA y/o DMSO, en preparación para la crioconservación. Las células de la placenta aisladas crioconservadas en el banco, según sea necesario, se descongelan y se diluyen, p. ej., con una solución que comprende dextrano 40 al 10%, como se describe en la presente memoria. En ciertas realizaciones del método, el método de filtración y dilución descrito en la presente memoria no es una parte del aislamiento inicial de las células de la placenta aisladas.

50 En ciertas realizaciones, dichas células de la placenta aisladas se obtienen por perfusión de la placenta después del parto cuya sangre se ha drenado y perfundido para eliminar la sangre residual. En otra realización más específica, dichas células de la placenta aisladas se obtienen por rotura física y/o enzimática de tejido de la placenta.

60

**4. Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 presenta un diagrama ternario que muestra un espacio de la solución de HSA, dextrano 40 y DMSO y el diseño experimental para evaluar el efecto de la variación de la concentración de los componentes en la viabilidad y proliferación celular.

5 La FIG. 2 presenta los datos del Análisis de Retención en Filtro (FRA) para formulaciones que comprenden diferentes porcentajes de DMSO. Los datos se expresan en píxeles por millón de células cargadas (px/MM) leídos en un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell. Control del análisis = solución de dextrano 40 al 100%, con colorante celular, sin células.

10 La FIG. 3 presenta los datos de FRA para formulaciones celulares que comprenden diferentes fracciones en volumen de HSA. Los datos se expresan en píxeles por millón de células cargadas (px/MM) leídos en un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell. Control del análisis = solución de dextrano 40 al 100%, con colorante celular, sin células.

La FIG. 4 presenta la viabilidad en azul de tripán después de la descongelación para formulaciones celulares que comprenden diferentes porcentajes de DMSO (0-20%).

15 La FIG. 5 presenta la recuperación celular total después de la descongelación como una función de las concentraciones variables de DMSO (0-20%).

FIG. 6: Restablecimiento del cultivo como una función de las formulaciones variables que comprenden diferentes porcentajes de DMSO, según se evaluó por medio del análisis MTS (véase la Sección 6.3.1, a continuación).

20 La FIG. 7 presenta la viabilidad celular después de la descongelación de formulaciones celulares que comprenden diferentes fracciones en volumen de HSA al 25%.

La FIG. 8 presenta la recuperación celular total después de la descongelación como una función de la fracción en volumen de HSA.

25 La FIG. 9 presenta datos que evalúan el restablecimiento del cultivo como una función de las diferentes fracciones de HSA, generadas a través del uso de Cell Titer 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, Wisconsin).

FIG. 10: Niveles de inmunosupresión, evaluados por medio de Análisis de Reacción con Esferas (Bead Reaction Assay) para formulaciones que comprenden diferentes concentraciones de componentes de formulación.

30 FIG. 11: Agregación celular como una función de la variación de las densidades variables de células en congelación ( $1-40 \times 10^6$  células/ml), según se determina por medio del análisis FRA. Los datos se expresan en píxeles por millón de células cargadas (px/MM) leídos en un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell.

FIG. 12 Agregación celular como una función de densidades de células en congelación (1-40 millones de células/ml). Los datos se expresan en píxeles por millón de células cargadas (px/MM) leídos en un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell.

35 FIG. 13: Agregación celular como una función de los pesos moleculares variables de dextrano, según se determina por medio del análisis FRA. Equivalente de la señal FRA en dextrano 1.000, 40.000 y 70.000 (es decir, dextrano 1, dextrano 40 y dextrano 70, respectivamente). Los datos se expresan en píxeles por millón de células cargadas (px/MM). Control de análisis = solución de dextrano 40 al 100%, con colorante celular, sin células.

La FIG. 14 presenta la viabilidad después de la descongelación a través de formulaciones que comprenden diferentes pesos moleculares de dextrano.

40 La FIG. 15 presenta la recuperación de células a través de formulaciones que comprenden diferentes pesos moleculares de dextrano.

La FIG. 16 presenta  $CD105^+/CD200^+$  a través de formulaciones que comprenden diferentes pesos moleculares de dextrano.

45 La FIG. 17 presenta datos de cuentas de reacción de células T en esferas (BTR) a través de formulaciones que comprenden diferentes pesos moleculares de dextrano.

La FIG. 18 presenta la agregación celular medida por FRA a través de formulaciones que comprenden diferentes polisacáridos. Control de análisis = solución de dextrano 40 al 100%, con colorante celular, sin células.

La FIG. 19 presenta la viabilidad después de la descongelación de las células formuladas con polisacáridos distintos de dextrano 40. Los datos se expresan en píxeles por millón de células cargadas (px/MM).

50 FIG. 20: Recuperación de células viables como una función de las formulaciones que comprenden diferentes

polisacáridos.

La FIG. 21 presenta la expresión de CD105<sup>+</sup>/CD200<sup>+</sup> en formulaciones celulares que comprenden dextrano 40, o maltodextrano, sacarosa, trehalosa, heparina, hetalmidón o glucógeno en lugar de dextrano 40.

5 La FIG. 22 presenta los datos de BTR para dextrano 40 y seis azúcares/polisacáridos distintos de dextrano 40 diferentes.

La FIG. 23 presenta la agregación celular medida por FRA a través de formulaciones que comprenden albúmina de suero humano (HSA) al 10%, albúmina de suero bovino (BSA) al 10% o suero bovino fetal al 10% (FBS). Control de análisis = solución de dextrano 40 al 100%, con colorante celular, sin células.

10 FIG. 24: Viabilidad celular después de la descongelación a través de formulaciones que comprenden HSA al 10%, BSA al 10% o FBS al 10%.

La FIG. 25 presenta la recuperación después de la descongelación a través de formulaciones que comprenden HSA al 10%, HSA al 4%, BSA al 10% o FBS al 10%.

La FIG. 26 presenta la identidad celular medida por medio de la expresión de CD105<sup>+</sup>/CD200<sup>+</sup> a través de formulaciones que comprenden HSA al 10%, HSA al 4%, BSA al 10% o FBS al 10%.

15 La FIG. 27 presenta la expresión de CD34-/CD10<sup>+</sup> a través de formulaciones que comprenden HSA al 10%, BSA al 10% o FBS al 10%.

La FIG. 28 presenta la funcionalidad celular medida por medio del análisis BTR a través de formulaciones que comprenden HSA al 10%, HSA al 4%, BSA al 10% o FBS al 10%.

20 La FIG. 29 presenta los resultados de la agregación celular FRA de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BMMSC) y células asesinas naturales (NK). Los datos se expresan en píxeles por millón de células cargadas (px/MM).

## 5. Descripción detallada

### 5.1 Definiciones

25 Según se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" significa, p. ej., dentro del 10% de una cifra o valor indicados.

Según se utiliza en la presente memoria, "macro-cúmulo de células" significa una agregación de células visible sin aumento, p. ej., visible a simple vista, y en general se refiere a una agregación de células mayor de aproximadamente 150 micras.

30 Según se utiliza en la presente memoria, "micro-cúmulo de células" significa una agregación de células visible sólo con aumento, y en general se refiere a una agregación de células menor de aproximadamente 150 micras.

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

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

35 Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula aislada", p. ej., "célula madre aislada", significa una célula que está separada sustancialmente de otras células del tejido, p. ej., la placenta, del que deriva la célula. Una célula está "aislada" si al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o al menos 99% de las células con las que la célula se asocia de forma natural, se elimina de la célula, p. ej., durante la recogida y/o cultivo de la célula.

40 Según se utiliza en la presente memoria, "pluripotente", cuando se refiere a una célula, significa que la célula tiene la capacidad de diferenciarse en algunos, pero no necesariamente todos, los tipos de células del organismo, o en células que tienen características de algunos, pero no todos, los tipos de células del organismo. En ciertas realizaciones, por ejemplo, una célula pluripotente aislada que tiene la capacidad de diferenciarse en cualquiera de las células que tienen las características de las células condrogénicas u osteogénicas es una célula pluripotente.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término "población de células aisladas" significa una población de células que se separa sustancialmente de otras células de un tejido, p. ej., la placenta, del cual deriva la población de células.

50 Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula madre de la placenta" se refiere a una célula madre o células progenitora que deriva de una placenta de mamífero, independientemente de la morfología, los marcadores de superficie celular, o el número de pases después de un cultivo primario. Una célula madre de la placenta no se obtiene, y no se puede obtener, de sangre, p. ej., sangre del cordón umbilical o sangre de placenta. Los términos

"células madre de la placenta" y "células pluripotentes de la placenta", según se utilizan en la presente memoria, sin embargo, no se refieren a, y las células madre de la placenta y las células pluripotentes de la placenta no son, trofoblastos, angioblastos, hemangioblastos, células germinales embrionarias, células madre embrionarias, o células obtenidas de la masa celular interna de un blastocisto, una célula obtenida de una cresta gonadal embrionaria, p. ej., una célula germinal embrionaria. Una célula se considera una "célula madre" si la célula muestra atributos de una célula madre, p. ej., un marcador o perfil de expresión de genes asociados con uno o más tipos de células madre; la capacidad para replicar por lo menos 10-40 veces en cultivo, la capacidad para diferenciarse en células de una o más de las tres capas germinales; la falta de características de las células adultas (es decir, diferenciadas), o similares. Los términos "células madre de la placenta" y "células madre derivadas de la placenta" se pueden utilizar indistintamente. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, el término "de la placenta" incluye el cordón umbilical. Las células madre de la placenta descritas en la presente memoria, en ciertas realizaciones, se diferencian *in vitro* (en condiciones de diferenciación), se diferencian *in vivo*, o ambas.

Según se utiliza en la presente memoria, una célula, p. ej., una célula madre, es "positiva" para un marcador particular, cuando ese marcador es detectable por encima del fondo. Por ejemplo, una célula madre de la placenta es positiva, p. ej., para CD73 porque CD73 es detectable en las células madre de la placenta en una cantidad detectablemente mayor que el fondo (en comparación, p. ej., con 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 es expresado por la célula. En el contexto, p. ej., de la detección mediada por anticuerpos, "positivo", como una indicación de que un marcador de la superficie celular particular está presente, significa que el marcador es detectable utilizando un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo marcado fluorescentemente, específico para ese marcador; "positivo" también se refiere a una célula que presenta ese marcador en una cantidad que produce una señal, p. ej., en un citómetro, que está detectablemente por encima del fondo. Por ejemplo, una célula es "CD200<sup>+</sup>" cuando la célula está marcada de manera detectable con un anticuerpo específico para CD200, y la señal del anticuerpo es detectablemente más alta que la de un control (p. ej., el fondo o un control de isotipo). A la inversa, "negativo" en el mismo contexto significa que el marcador de la superficie celular no es detectable utilizando un anticuerpo específico para ese marcador en comparación con el fondo. Por ejemplo, una célula es "CD34<sup>-</sup>", cuando la célula no está marcada de forma detectable reproduciblemente con un anticuerpo específico para CD34 en un grado mayor que un control (p. ej., el fondo o un control de isotipo). Se determina que los marcadores no detectados, o no detectables, utilizando anticuerpos son positivos o negativos de una manera similar, utilizando un control apropiado. Por ejemplo, se puede determinar que una célula o población de células son OCT-4<sup>+</sup> si la cantidad de ARN de OCT-4 detectada en el ARN de la célula o población de células es detectablemente mayor que el fondo según se determina, p. ej., mediante un método de detección de ARN, tal como RT-PCR, transferencias de ranura, etc. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, los cúmulos de diferenciación ("CD") marcadores se detectan utilizando anticuerpos. Se puede determinar si OCT-4 está presente, y una célula es "OCT-4<sup>+</sup>", si el ARN de OCT-4 es detectable mediante RT-PCR.

## 5.2 Composiciones mejoradas que comprenden células y métodos de elaboración de las composiciones

Se proporcionan en la presente memoria métodos mejorados de elaboración de composiciones que comprenden células de mamífero, p. ej., células madre, p. ej., células madre de la placenta, y composiciones mejoradas, p. ej., composiciones farmacéuticas, producidas de este modo. Las composiciones, p. ej., composiciones administrables en forma líquida, que comprenden las células son generalmente mejor toleradas por un destinatario, p. ej., cuando los cúmulos de células, en particular los cúmulos de células visibles a simple vista (es decir, macro-cúmulos), se eliminan antes de la administración de la composición farmacéutica a un individuo. Los métodos de preparación de las composiciones que comprenden las células, p. ej., células madre, tales como las células madre de una placenta después del parto humano cuya sangre se ha drenado, las células de la placenta, como se describe en la presente memoria, dan como resultado composiciones que son sustancialmente mejor toleradas cuando se administran a un individuo.

Específicamente, la presente invención proporciona un método de elaboración de una composición que comprende células de mamífero, que comprende:

- (a) poner en contacto dichas células con una solución que comprende (1) de dextrano, maltodextrano, trehalosa o hetalmidón; y (2) albúmina de suero humano (HSA) para formar una solución que contiene células;
- (b) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 micrómetros a 100 micrómetros;
- (c) si dicha solución que contiene células comprende más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, diluir dichas células a no más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro con una primera solución de dilución que comprende dextrano.

En una realización del método de la presente invención, dichas células son crioconservadas tras la etapa (c). En otra realización, dicha solución en la etapa (a) comprende HSA al 10% (p/v). En otra realización de la invención, dicha primera dilución comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v). En una realización adicional más, dicha primera solución de

dilución comprende HSA al 10% (p/v). En otra realización, dicha solución en la etapa (a) o dicha primera solución de dilución comprenden adicionalmente un crioprotector, preferiblemente en donde dicho crioprotector en dicha primera solución de dilución es DMSO. En una realización adicional, el método de la presente invención comprende después de la etapa (c), la etapa (d) de dilución de la solución que contiene células con una segunda solución de dilución que comprende dextrano, maltodextrano, trehalosa o hetalmidón pero no comprende HSA, con lo que se elabora una composición que comprende células de mamíferos. En otra realización, dicha segunda solución de dilución comprende dextrano 40 al 5,5% o 10% (p/v). En una realización, dicho filtro es un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros. En una realización específica, dichas células de mamífero son células de la placenta adherentes humanas aisladas.

10 En una realización, el método de la presente invención comprende:

(a) suspender una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas en una solución de dextrano 40 al 5,5% (p/v), albúmina de suero humano (HSA) al 10% (p/v) para formar una solución que contiene células;

15 (b) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros;

(c) diluir la solución que contiene células en dextrano 40 al 5,5% (p/v), HSA al 10% (p/v), y DMSO al 5% a no más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro;

(d) crioconservar las células;

(e) descongelar las células; y

20 (f) diluir opcionalmente la solución que contiene las células de 1:1 a 1:11 con dextrano 40 al 10% (p/v) para producir dicha composición.

En una realización adicional, el método de la presente invención comprende:

(a) centrifugar una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas para recoger las células;

25 (b) resuspender las células en dextrano 40 al 5,5% (p/v);

(c) centrifugar las células para recoger las células;

(d) resuspender las células en una solución de dextrano 40 al 5,5% (p/v) que comprende albúmina de suero humano (HSA) al 10% (p/v) para formar una solución que contiene células;

30 (e) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros;

(f) diluir la solución que contiene células en dextrano 40 al 5,5% (p/v), HSA al 10% (p/v), y DMSO al 5% a no más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro;

(g) crioconservar las células;

(h) descongelar las células; y

35 (i) opcionalmente, diluir la solución que contiene las células de 1:1 a 1:11 con dextrano 40 al 10% (p/v) para producir dicha composición.

En una realización adicional más, el método de la presente invención comprende:

40 (a) proporcionar una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas en una solución que comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v) y albúmina de suero humano al 10% (HSA) (p/v) para formar una solución que comprende células de la placenta adherentes humanas aisladas;

(b) filtrar dicha solución que comprende células de la placenta adherentes humanas aisladas a través de un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros para producir células de la placenta adherentes humanas aisladas filtradas;

45 (c) diluir dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas filtradas con una cantidad de una solución que comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v), HSA al 10% (p/v) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% suficiente para llevar dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas filtradas a  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro; y

(d) diluir dicha células de la placenta adherentes humanas aisladas con dextrano 40 al 10% (p/v) a una razón

de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:11 células de la placenta adherentes humanas aisladas: dextrano 40 para producir dicha composición.

En otra realización, el método de la presente invención comprende:

- 5 (a) poner en contacto células de la placenta adherentes humanas aisladas con una solución que comprende dextrano al 5,5% (p/v) y albúmina de suero humano (HSA) al 10% (p/v);
- (b) filtrar las células de la placenta adherentes humanas aisladas a través de un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros; y
- (c) diluir dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas a  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro con una solución que comprende dextrano 40 al 10% (p/v),

10 en donde dicha composición no comprende macro-cúmulos de células, en donde un macro-cúmulo de células comprende una agregación de células mayor de aproximadamente 150 micrómetros.

En una realización del método de la presente invención, dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup>; preferiblemente dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup> son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En una realización adicional, dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> o CD90<sup>+</sup>. En una realización adicional más, dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>.

La presente invención también se refiere a una composición obtenible mediante los métodos de la presente invención. En una realización, la composición de la presente invención comprende una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas en una solución que comprende dextrano 40 al 4-10% (p/v), en donde dicha composición comprende entre  $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$  células por mililitro y  $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$  células por mililitro, y en donde dicha composición no comprende macro-cúmulos de células, en donde un macro-cúmulo de células comprende una agregación de células mayor de aproximadamente 150 micrómetros. En otra realización, la composición de la presente invención comprende menos de aproximadamente 100 micro-cúmulos de células por  $10^6$  células. En una realización adicional de la composición de la presente invención, las células de la placenta adherentes humanas aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup>; preferiblemente dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup> son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En una realización adicional de la composición de la presente invención, dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> o CD90<sup>+</sup>. En una realización adicional más de la composición de la presente invención, dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>.

En una realización, se proporciona en la presente memoria un método de elaboración de una composición, que comprende filtrar una disolución que comprende células (1) dextrano, maltodextrano, trehalosa o hetalmidón y (2) albúmina de suero humano (HSA) a través de un filtro de 70  $\mu$ M a 100  $\mu$ M para producir una solución que contiene células filtrada; diluir la solución que contiene células filtrada con una primera solución de dilución que comprende dextrano a no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, p. ej., antes de la criopreservación; y, opcionalmente, diluir la solución que contiene células filtrada resultante con una segunda solución de dilución que comprende dextrano pero no comprende HSA para producir dicha composición. En otra realización, se proporciona en la presente memoria un método de elaboración de una composición, que comprende filtrar una solución que comprende células (1) dextrano, maltodextrano, trehalosa o hetalmidón y (2) albúmina de suero humano (HSA) a través de un filtro de 70  $\mu$ M a 100  $\mu$ M para producir una solución que contiene células filtrada; diluir la solución que contiene células filtrada con una primera solución de dilución que comprende dextrano a no más de aproximadamente 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro, p. ej., antes de la criopreservación; y, opcionalmente, diluir la solución que contiene células filtrada resultante con una segunda solución de dilución que comprende dextrano pero no comprende HSA para producir dicha composición.

En una realización específica, las células de mamífero son células madre. En una realización más específica, las células madre son células madre mesenquimales derivadas de médula ósea o células madre adultas. En una realización específica, las células son células de la placenta aisladas. En una realización más específica, las células de la placenta aisladas son células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta. En otra realización específica, las células son células de líquido perfundido de la placenta, p. ej., células nucleadas de líquido perfundido de la placenta. Los métodos para obtener células de líquido perfundido de la placenta se describen en la Sección 5.3.4, a continuación.

En una realización específica, las células son criopreservadas entre dicha dilución con una primera solución de dilución y dicha dilución con dicha segunda solución de dilución. En otra realización específica, la primera solución de dilución comprende dextrano y HSA. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución es dextrano a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano 1. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución y dicha segunda solución de dilución es dextrano 1. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano 70. En otra realización específica, dicha primera solución de dilución y dicha segunda solución de dilución es dextrano 70. En

otra realización específica, el dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano 40. En otra realización específica, el dextrano en dicha primera solución de dilución y dicha segunda solución de dilución es dextrano 40. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 de aproximadamente 2,5% a dextrano 40 a aproximadamente 10%. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 a aproximadamente 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% o 10%. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 a aproximadamente 5,5%.

En otras realizaciones, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución pueden comprender un polisacárido además de o distinto, es decir, en lugar de, dextrano. En ciertas realizaciones, el polisacárido es un polímero (2 o más subunidades) de glucosa, y no comprende subunidades de sacáridos que no sean de glucosa. En otras realizaciones, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución comprenden uno o más de maltodextrina (p. ej., maltodextrina a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75 %, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), trehalosa (p. ej., trehalosa a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), o hetalmidón (p. ej., hetalmidón a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5 %, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%). En otras realizaciones, la primera y/o segunda soluciones de dilución comprenden uno o más de sacarosa (p. ej., sacarosa a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75 %, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), heparina (p. ej., heparina de aproximadamente 55 unidades USP/ml), o glucógeno (p. ej., glucógeno a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5 %, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%). En una realización particular, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución comprenden maltodextrano además de o distinto, es decir, en lugar de, dextrano. En otra realización particular, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución comprenden trehalosa además de o distinto, es decir, en lugar de, dextrano. En otra realización particular, dichas primera y/o segunda soluciones de dilución comprenden hetalmidón además de o distinto, es decir, en lugar de, dextrano.

En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA de aproximadamente 1 a 17%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% o aproximadamente 17%. En otra realización específica, dicho HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA a aproximadamente 4 - 10%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA a aproximadamente 3,125%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA al 5%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA al 10%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA a aproximadamente 16,875%. En otra realización específica, dicha primera solución de dilución comprende HSA. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA a aproximadamente 1 a 17%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% o 17%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA al 4 a 10%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA a aproximadamente 3,125%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA a aproximadamente 5%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA a aproximadamente 10%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera dilución es HSA a aproximadamente 16,875%.

En otras realizaciones, se puede utilizar albúmina de suero bovino (BSA) (p. ej., BSA a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%) o suero bovino fetal (FBS) (p. ej., FBS a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10 %, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%) además de HSA en dicha solución.

En algunas realizaciones, la razón de HSA con respecto a dextrano, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70, en la primera solución está entre aproximadamente HSA:dextrano 6:1 y HSA:dextrano aproximadamente 1:2,6. En algunas realizaciones, la razón de HSA con respecto a dextrano es HSA:dextrano de aproximadamente 6:1, 5,5:1, 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2,0:1, 1,5:1, 1:1, 1:1,5, 1:2 o 1:2,6. En algunas realizaciones, la razón de HSA con respecto a dextrano, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70, en la primera solución es de aproximadamente HSA al 3,13%/dextrano al 8,25%. En algunas realizaciones, la razón de HSA con respecto a dextrano, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70, en la primera solución es de aproximadamente HSA al 16,88%/dextrano al 2,75%. En realizaciones particulares, la razón de HSA con respecto a dextrano, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70, en la primera solución es de aproximadamente HSA al 10%/dextrano al 5,5%, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70.

En otra realización específica, dicha primera solución de dilución comprende adicionalmente un crioprotector. En una realización más específica, dicho crioprotector es dimetilsulfóxido (DMSO). En una realización particular, dicha

- primera solución de dilución comprende adicionalmente DMSO de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% o de aproximadamente 10% a aproximadamente 15%. En una realización particular, dicha primera solución de dilución comprende adicionalmente DMSO a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%. En una realización particular, dicha primera solución de dilución comprende adicionalmente DMSO a aproximadamente 5%.
- En una realización específica, dicha primera solución de dilución comprende dextrano 40 a aproximadamente 5,5%, HSA a aproximadamente 10%, y DMSO a aproximadamente 5%.
- En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha segunda solución de dilución es dextrano 40 a aproximadamente 10%. En otra realización específica, dicha composición que comprende células comprende dextrano a aproximadamente 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5 %, 5,75%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5% 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% o 10%. En otra realización específica, dicha composición que comprende células comprende dextrano de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9%. En otra realización específica, dicha composición comprende de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células por mililitro a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células por mililitro. En otra realización específica, dicha composición comprende 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. En una realización específica, dicha segunda solución de dilución no comprende HSA.
- El dextrano utilizable en los métodos proporcionados en la presente memoria puede ser dextrano de peso molecular entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 150 kDa, p. ej., 1 kDa (dextrano 1), aproximadamente 40 kDa (dextrano 40) o aproximadamente 70 kDa (dextrano 70).
- En otra realización específica, la solución que comprende células comprende un crioprotector. Si la solución que comprende células comprende menos de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, la primera etapa de dilución se puede omitir, y, en ciertas realizaciones, la solución en la que se suspenden las células puede comprender un crioprotector, p. ej., DMSO, p. ej., DMSO de aproximadamente 2% a aproximadamente 15%, p. ej., DMSO a aproximadamente 5%.
- En otra realización, se proporciona en la presente memoria un método de elaboración de una composición, que comprende: (a) filtrar a través de un filtro de 70  $\mu$ M a 100  $\mu$ M una solución que comprende células, p. ej., células aisladas de la placenta, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, o células aisladas de líquido perfundido de la placenta, p. ej., células nucleadas totales aisladas a partir de líquido perfundido de la placenta, dextrano y albúmina de suero humano (HSA) para producir una solución que contiene células filtrada; (b) si dicha solución que contiene células comprende más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro diluir dicha solución que contiene células filtrada a aproximadamente 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro con una primera solución de dilución que comprende dextrano; y (c) diluir opcionalmente la solución que contiene células filtrada con una segunda solución de dilución que comprende dextrano pero no comprende HSA, elaborando de ese modo una composición. En algunas realizaciones, la etapa (b) se lleva a cabo cuando la solución que contiene células filtrada en (a) comprende más de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (b) es de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza cuando la solución que contiene células filtrada en (a) comprende más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (b) es a aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En algunas realizaciones en las que dicha solución que contiene células filtrada comprende menos de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, la dilución en la etapa (b) se omite y la solución en la etapa (a) comprende un crioprotector, p. ej., DMSO, p. ej., DMSO de aproximadamente 2% a aproximadamente 15%. En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza cuando la solución que contiene células filtrada en (a) comprende más de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro, en donde dicha dilución en la etapa (b) es a aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro. En una realización específica del método, dichas células son crioprotectadas antes de la etapa (c). En una realización específica del método, dichas células son crioprotectadas antes de la etapa (c). En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano 40. En otra realización específica, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución y dicha segunda solución de dilución es dextrano 40. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 al 5,0%. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 al 5,5%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende células es de HSA a aproximadamente 1% a HSA a aproximadamente 15%. En otra realización específica, dicha primera solución de dilución comprende HSA. En una realización más específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA al 5% o, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA al 10%. En otra realización específica, dicha primera solución de dilución comprende adicionalmente un crioprotector. En una realización más específica, dicho crioprotector es DMSO, p. ej., DMSO de aproximadamente 2% a aproximadamente 15%. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha segunda solución de dilución es dextrano 40 al 10%. En otra realización específica, dicha solución en la etapa (a) comprende un crioprotector.
- En un aspecto del método, el número de cúmulos de células en la composición final que comprende células se reduce o elimina utilizando la filtración, preferiblemente antes de la crioprotectación. En ciertas realizaciones en las

que las células en la solución que contiene células son criopreservadas, la solución que contiene células se filtra antes de la criopreservación. Por ejemplo, las células, p. ej., las células madre de la placenta, en solución se pueden hacer pasar a través de un filtro antes de la criopreservación para eliminar los cúmulos de células visibles (agregaciones de células, es decir, macro-cúmulos de células). De acuerdo con la invención, la filtración comprende  
 5 filtrar la solución que contiene células a través de un filtro antes de la criopreservación de dichas células, en donde dicho filtro comprende poros de entre aproximadamente 70  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  de diámetro (es decir, el filtro es un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a un filtro de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ ), en donde el filtro es adecuado para filtrar soluciones que comprenden células. Por ejemplo, el filtro puede ser un filtro que comprende poros entre  
 10 aproximadamente 70 y aproximadamente 80  $\mu\text{M}$ , entre aproximadamente 70  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 90  $\mu\text{M}$ , entre aproximadamente 70  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , entre aproximadamente 80  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  o, entre aproximadamente 90  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , puede ser un filtro de 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100  $\mu\text{M}$ . En una realización específica, dicho filtro es un filtro de 70  $\mu\text{M}$ . En otra realización específica, dicho filtro es un filtro de 100  $\mu\text{M}$ . En otra realización específica, dicho filtro es un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a un filtro de 100  $\mu\text{M}$ . En otra realización específica, dicha solución que contiene células se filtra después de la descongelación, además de ser filtrada antes  
 15 de la congelación.

En diversas realizaciones, el método de elaboración de una composición que comprende células, p. ej., células de la placenta aisladas, comprende criopreservar las células a no más de aproximadamente  $10 \times 10^6$ ,  $9,5 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $8,5 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $6,5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $5,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $4,5 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $3,5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ , o  $2,5 \times 10^6$  células por mililitro. En una realización específica, las células son criopreservadas en no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En otra realización específica, las células son criopreservadas en no más de aproximadamente  $13 \times 10^6$  células por mililitro. En otra realización específica, las células son criopreservadas en no más de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células por mililitro. En otra realización específica, las células son criopreservadas en aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro. En otra realización específica, las células son criopreservadas en aproximadamente  $5 \times 10^6$  células por mililitro. En otra realización específica, las células son criopreservadas en aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro. En una realización específica, las células son criopreservadas en aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En otra realización específica, dichas células son criopreservadas en un número que, cuando dichas células se descongelan y se diluyen de 1:1 a 1:11 (v/v), p. ej., 1:1 a 1:5 (v/v), con dextrano 40, p. ej., dextrano 40 al 10%, da como resultado la formación de 2 o menos cúmulos de células visibles (es decir, macro-cúmulos de células) por cada  $10^6$  células. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas son criopreservadas en un número que, cuando dichas células se descongelan y se diluyen de 1:1 a 1:11 (v/v), p. ej., de 1:1 a 1:5 (v/v), con dextrano 40, p. ej., dextrano 40 al 10%, da como resultado la formación de cúmulos de células no visibles. En otra realización específica, dichas células son criopreservadas en un número que, cuando dichas células se descongelan y se diluyen de 1:1 a 1:11 (v/v), p. ej., de 1:1 a 1:5 (v/v), con dextrano 40 al 10%, da como resultado la formación de  
 20 menos de aproximadamente 150, 140, 130, 120, 110 o 100 micro-cúmulos de células por  $10^6$  células.

En otra realización, el método de elaboración de una composición comprende poner en contacto las células, p. ej., células de la placenta aisladas, después de la criopreservación con una solución que comprende dextrano 40, p. ej., resuspendiendo las células o diluyendo las células en una solución que comprende dextrano 40. En una realización específica, la solución comprende dextrano 40 de aproximadamente 2,5% a dextrano 40 a aproximadamente 10% (p/v). En realizaciones específicas, la solución comprende dextrano 40 de aproximadamente 5% a dextrano 40 a aproximadamente 10% (p/v). En otra realización específica, la solución es una solución de dextrano al 5,0% o una solución de dextrano al 10%. En otra realización específica, la solución es una solución de dextrano al 5,5% o una solución de dextrano al 10%. En otras realizaciones, el dextrano tiene un peso molecular, p. ej., un peso molecular medio, entre aproximadamente 1 kilodalton y aproximadamente 150 kilodalton. En otras realizaciones, el dextrano tiene un peso molecular, p. ej., un peso molecular medio, entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 150 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 125 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 75 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 50 kDa, o de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 25 kDa. En otras realizaciones, el dextrano tiene un peso molecular, p. ej., un peso molecular medio, entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 10 kDa, de aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 50 kDa, o de aproximadamente 60 kDa a aproximadamente 80 kDa. En otras realizaciones, la solución comprende entre dextrano a aproximadamente 2% y dextrano a aproximadamente 25%. En una realización específica, dicha solución no comprende HSA. En otra realización específica, dicha solución tiene densidad adaptada a dichas células, p. ej., dichas células madre de la placenta, p. ej., la solución está dentro de 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de la densidad de las células de la placenta aisladas.  
 40 En otra realización específica, la solución tiene una densidad que no está adaptada a dichas células.  
 45  
 50  
 55

En otra realización, el método de elaboración de una composición que comprende células, por ejemplo, células de la placenta aisladas, comprende (a) filtrar una solución que contiene células que comprende dichas células antes de la criopreservación a través de un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , (b) criopreservar las células a aproximadamente  $1$  a  $10 \times 10^6$  células por mililitro; (c) descongelar las células; y (d) diluir la solución que contiene células de aproximadamente 1:1 (v/v) a aproximadamente 1:11 con una solución de dextrano 40. En ciertas realizaciones, se criopreservan aproximadamente  $10 \times 10^6$  células en la etapa (b). En ciertas realizaciones, las células se criopreservan en la etapa (b) a no más de  $10 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertas realizaciones, se criopreservan no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro en la etapa (b). En una realización más específica, las células en la etapa (b) se  
 60

crioconservan en una solución que comprende dextrano 40 y HSA de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%.

En otra realización, el método de elaboración de una composición comprende las siguientes etapas:

- 5 (a) filtrar una solución que comprende células, solución de dextrano 40 al 5,5% y HSA al 10% a través de un filtro de 70  $\mu\text{M}$  para producir una solución que contiene células filtrada;
- (b) diluir la solución que contiene células filtrada con una solución que comprende dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10%, y DMSO al 5% a aproximadamente 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro;
- (c) crioconservar las células en dicha solución que contiene células filtrada;
- (e) descongelar las células; y
- 10 (f) diluir opcionalmente la solución que contiene células filtrada con dextrano 40 al 10%.

En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (b) es a no más de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (b) es a no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células/ml. En realizaciones en las que la solución que contiene células filtrada comprende menos de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células/ml, la solución en la etapa (a) comprende un crioprotector, p. ej., DMSO, p. ej., DMSO de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, y se omite la etapa (b). En algunas realizaciones, la etapa (f) comprende la dilución de la solución que contiene células filtrada de 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano 40 al 10%. En algunas realizaciones, la etapa (f) comprende la dilución de la solución que contiene células filtrada de 1:1 a 1:5 (v/v) con dextrano 40 al 10%.

En otra realización, el método de elaboración de una composición proporcionada en la presente memoria comprende las siguientes etapas:

- (a) centrifugar una pluralidad de células para recoger las células;
- (b) resuspender las células en dextrano 40 al 5,5%;
- (c) centrifugar las células para recoger las células;
- 25 (d) resuspender las células en una solución de dextrano 40 al 5,5% que comprende HSA al 10% para producir una solución que contiene células;
- (e) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70  $\mu\text{M}$  para producir una solución que contiene células filtrada;
- (f) diluir la solución que contiene células filtrada en dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10%, y DMSO al 5% a aproximadamente 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro;
- 30 (g) crioconservar las células en dicha solución que contiene células filtrada;
- (h) descongelar las células; y
- (i) opcionalmente, diluir la solución que contiene células filtrada con dextrano 40 al 10%.

En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) es a no más de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) es a no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células/ml. En realizaciones en las que dicha resuspensión en la etapa (d) produce una solución que contiene células que comprende menos de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células/ml, la solución en la etapa (d) comprende un crioprotector, p. ej., DMSO, p. ej., DMSO de aproximadamente 1 a aproximadamente 5%, y la etapa (f) se omite. En algunas realizaciones, la etapa (i) comprende la dilución de la solución que contiene células filtrada de 1:1 a 1:5 (v/v) con dextrano 40 al 10%. En algunas realizaciones, la etapa (i) comprende la dilución de la solución que contiene células filtrada de 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano 40 al 10%.

En una realización específica de cualquiera de los métodos anteriores, el DMSO se elimina sustancialmente de la composición que comprende células, de manera que la concentración final de DMSO en la composición sea menor de aproximadamente 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% o aproximadamente 0,1%. La eliminación de DMSO se puede lograr, p. ej., por centrifugación de las células y resuspensión de las células en dextrano 40 al 10%. Semejante etapa de centrifugación y resuspensión se puede repetir una o más veces.

En otra realización específica de cualquiera de los métodos anteriores, el método comprende adicionalmente la concentración de la composición de células resultante de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células por mililitro a  $1 \times 10^8$  células por mililitro. Semejante composición es útil, por ejemplo, para la administración subcutánea de la composición a un individuo que lo necesite.

- En otra realización específica de cualquiera de los métodos anteriores, la célula es una célula distinta de una célula madre de la placenta. En realizaciones más específicas, por ejemplo, las células pueden ser células madre o células no madre. En realizaciones específicas en las que las células son células madre, las células madre pueden ser, p. ej., células madre adultas, células madre somáticas, células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre de cordón umbilical, células madre de líquido amniótico, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón, células madre mesenquimales derivadas de sangre periférica, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo o células madre derivadas de periostio. En otra realización específica, las células son células asesinas naturales, p. ej., células asesinas naturales CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>.
- En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria composiciones, p. ej., una composición farmacéutica elaborada por medio de los métodos anteriores. En ciertas realizaciones, las composiciones carecen de cúmulos de células visibles, es decir, macro-cúmulos de células. En otras ciertas realizaciones, las composiciones comprenden un número sustancialmente reducido de micro-cúmulos de células (aquellos que sólo son visibles con un microscopio, p. ej., un microscopio óptico) en comparación con composiciones que no han sido filtradas, p. ej., aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% menos micro-cúmulos de células.
- En una realización, se proporciona en la presente memoria una composición, p. ej., una composición farmacéutica, que comprende una pluralidad de células, p. ej., una pluralidad de células de la placenta aisladas, o células aisladas de líquido perfundido de la placenta, p. ej., células nucleadas totales de líquido perfundido de la placenta, en una solución que comprende dextrano 40 al 10%, en donde dicha composición 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 donde dicha composición no comprende cúmulos de células visibles (es decir, no comprende macro-cúmulos de células). En algunas realizaciones, dicha composición comprende entre aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células por mililitro y aproximadamente  $3,75 \times 10^6$  células por mililitro. En otras ciertas realizaciones, la composición comprende entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células por mililitro y  $6,5 \times 10^6$  células por mililitro, por ejemplo, entre aproximadamente  $1,3 \times 10^6$  células por mililitro y aproximadamente  $6,5 \times 10^6$  células por mililitro. En una realización específica, dichas células han sido crioconservadas y descongeladas. De acuerdo con la invención, dichas células se han filtrado a través de un filtro de 70  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. En otra realización específica, dicha composición no comprende macro-cúmulos de células. En otra realización específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 200 micro-cúmulos de células por cada  $10^6$  células. En otra realización específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 150 micro-cúmulos de células por cada  $10^6$  células. En otra realización específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 100 micro-cúmulos de células por cada  $10^6$  células. En otra realización específica, dicha composición comprende DMSO a menos de 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, o 0,1%.
- En algunas realizaciones, las composiciones anteriores comprenden dextrano a aproximadamente 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%, p. ej., dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70. En una realización específica, dicha composición comprende dextrano 40 de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9%. En una realización específica, dicha composición comprende dextrano 40 a aproximadamente 5,5%.
- En otras realizaciones, dicha composición comprende un polisacárido además de o distinto, es decir, en lugar de, dextrano. En ciertas realizaciones, el polisacárido es un polímero de glucosa que no comprende subunidades de sacárido distintas de glucosa. En otras realizaciones, dicha composición comprende maltodextrina (p. ej., maltodextrina a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), trehalosa (p. ej., trehalosa a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), o hetalmidón (p. ej., hetalmidón a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%). En otras realizaciones, dicha composición comprende sacarosa (p. ej., sacarosa a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%), heparina (p. ej., heparina de 55 unidades USP/ml), o glucógeno (p. ej., glucógeno a aproximadamente 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%, 5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75%, o 10%). En una realización particular, dicha composición comprende maltodextrano además de o distinto, es decir, en lugar de, dextrano. En otra realización particular, dicha composición comprende trehalosa además de, o en lugar de dextrano. En otra realización particular, dicha composición comprende hetalmidón además de, o en lugar de dextrano.
- En otra realización específica, dicha composición comprende HSA de aproximadamente 1% a aproximadamente 17%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende HSA de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, o aproximadamente 17%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende HSA a aproximadamente 3,125%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende HSA a aproximadamente 5%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende HSA a aproximadamente

10%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende HSA a aproximadamente 16,875%.

En otras realizaciones, dicha composición comprende albúmina de suero bovino (BSA) (p. ej., BSA a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%) o suero bovino fetal (FBS) (p. ej., FBS a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9 %, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%), además de HSA.

En algunas realizaciones, la composición comprende un crioprotector, p. ej., DMSO, p. ej., DMSO de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende DMSO de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende DMSO de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% o de aproximadamente 10% a aproximadamente 15%. En algunas realizaciones, dicha composición comprende DMSO a aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%. En una realización particular, la composición comprende DMSO a aproximadamente 5%.

Además se proporcionan en la presente memoria composiciones que comprenden células, en donde dichas composiciones son producidas por medio de uno de los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en una realización, se proporciona en la presente memoria una composición que comprende células, en donde dicha composición es producida por medio de un método que comprende filtrar una solución que comprende las células a través de un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  para formar una solución que contiene células filtrada; diluir la solución que contiene células filtrada con una primera solución que comprende dextrano a aproximadamente 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro, p. ej., antes de la crioconservación; y diluir la solución que contiene células filtrada resultante con una segunda solución que comprende dextrano pero no comprende HSA para producir dicha composición. En ciertas realizaciones, dicha dilución es a no más de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución es a no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución es a no más de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro. En una realización específica, las células son crioconservadas entre dicha dilución con una primera solución de dilución y dicha dilución con una segunda solución de dilución. En otra realización específica, la primera solución de dilución comprende dextrano y HSA. En otra realización específica, el dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano 40. En otra realización específica, el dextrano en dicha primera solución de dilución y dicha segunda solución de dilución es dextrano 40. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 al 5,0%. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 al 5,5%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA al 10%. En otra realización específica, dicha primera solución de dilución comprende HSA. En una realización más específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA al 10%. En otra realización específica, dicha primera solución de dilución comprende un crioprotector. En una realización más específica, dicho crioprotector es DMSO. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha segunda solución de dilución es dextrano 40 a aproximadamente 10%. En otra realización específica, dicha composición que comprende células comprende dextrano de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9%. De acuerdo con la invención, dicha composición que comprende células comprende 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. En otra realización específica, dicha composición que comprende células comprende de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células por mililitro a aproximadamente  $3,75 \times 10^6$  células por mililitro.

En otra realización, la composición que comprende células se elabora mediante un método que comprende (a) filtrar a través de un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  una solución que contiene células que comprende dichas células antes de la crioconservación para producir una solución que contiene células filtrada; (b) crioconservar las células en la solución que contiene células filtrada a aproximadamente 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro; (c) descongelar las células; y (d) diluir la solución que contiene células filtrada de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:11 (v/v) con una solución de dextrano 40. En una realización más específica, las células en la etapa (b) son crioconservadas a aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En una realización más específica, las células en la etapa (b) son crioconservadas en una solución que comprende dextrano 40 y HSA de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (d) es a no más de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células por mililitro.

En otra realización, la composición que comprende células se elabora mediante un método que comprende: (a) suspender las células en una solución de dextrano 40 al 5,5% que comprende HSA al 10% para formar una solución que contiene células; (b) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70  $\mu\text{M}$ ; (c) diluir la solución que contiene células con una solución que comprende dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10%, y DMSO al 5% a aproximadamente 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro; (d) crioconservar las células; (e) descongelar las células; y (f) diluir la solución que contiene las células 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano 40 al 10%. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (c) es a no más de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (c) es a no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células/ml. En otra realización, la composición que comprende células se elabora mediante un método que comprende: (a) centrifugar una pluralidad de células para recoger las células; (b) resuspender las células en dextrano 40 al 5,5%; (c) centrifugar las células para recoger

las células; (d) resuspender las células en una solución de dextrano 40 al 5,5% que comprende HSA al 10%; (e) filtrar las células a través de un filtro de 70 µM; (f) diluir las células en dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10%, y DMSO al 5% a aproximadamente 1 a 10 x 10<sup>6</sup> células por mililitro; (g) crioconservar las células; (h) descongelar las células; e (i) diluir las células de 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano 40 al 10%. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) es a no más de aproximadamente 10 x 10<sup>6</sup> células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) es a no más de aproximadamente 10 ± 3 x 10<sup>6</sup> células/ml.

Las composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas, que comprenden las células descritas en la presente memoria pueden comprender cualquier célula de mamífero, incluyendo células madre de mamíferos y células no madre de mamíferos. En algunas realizaciones, las composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas, que comprenden las células descritas en la presente memoria pueden comprender células de la placenta aisladas, p. ej., cualquiera de las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria (véase, p. ej., la Sección 5.3, más abajo). En una realización específica, las células de la placenta aisladas son CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> según se detecta por citometría de flujo. En una realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son células madre de la placenta. En otra realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son células pluripotentes de la placenta. En otra realización específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo neural, células de un fenotipo osteogénico, o células de un fenotipo condrogénico. En una realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislada son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En otra realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son adicionalmente CD90<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>, según se detecta por citometría de flujo. En otra realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> son adicionalmente CD90<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>, según se detecta por citometría de flujo. En otra realización más específica, las células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> son, adicionalmente, CD90<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>, según se detecta por citometría de flujo. En otra realización más específica, las células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, y CD45<sup>-</sup> son, adicionalmente, CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>, según se detecta por citometría de flujo.

En una realización más específica, las células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, son adicionalmente, uno o más de CD29<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> o SH4<sup>+</sup>. En otra realización más específica, las células son adicionalmente CD44<sup>+</sup>. En una realización específica de cualquiera de las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas anteriores, las células son, adicionalmente, uno o más de CD117<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, KDR(VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ, DR<sup>-</sup>, y/o ligando de muerte programada-1 (PDL1)<sup>+</sup>.

En otras ciertas realizaciones de las composiciones, dichas células de la placenta aisladas son CD200<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>; CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprende dichas células de la placenta aisladas cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embriode; u OCT-4<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta, que comprende las células de la placenta aisladas cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode; o cualquier combinación de los mismos. En una realización específica, dichas células CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización particular, dichas células OCT-4<sup>+</sup> son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. Las células de la placenta aisladas que pueden estar contenidas dentro de las composiciones que comprenden células, descritas en la presente memoria, se describen con más detalle en la sección 5.3, a continuación.

En otras realizaciones específicas de las composiciones proporcionadas en la presente memoria, la célula es una célula distinta de una célula madre de la placenta. En realizaciones más específicas, por ejemplo, las células pueden ser células madre o células no madre. En realizaciones específicas en las que las células son células madre, las células madre pueden ser, p. ej., células madre adultas, células madre somáticas, células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre de cordón umbilical, células madre de líquido amniótico, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón, células madre mesenquimales derivadas de sangre periférica, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo o células madre derivadas de periostio. En otra realización específica, las células son células asesinas naturales, p. ej., células asesinas naturales CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>.

### 5.3 Células de la placenta aisladas y poblaciones de células de la placenta aisladas

Las células pluripotentes de la placenta aisladas útiles en las composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas, proporcionadas en la presente memoria se pueden obtener a partir de una placenta o una parte de la misma, que se adhieren a un sustrato de cultivo de tejidos y tienen características de células pluripotentes o células madre. En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas útiles en los métodos descritos en la presente memoria tienen la capacidad de diferenciarse en tipos de células no placentarios. Las células de la placenta aisladas útiles en

los métodos descritos en la presente memoria pueden ser o bien de origen fetal o bien de origen materno (es decir, pueden tener el genotipo del feto o de la madre, respectivamente). Preferiblemente, las células de la placenta aisladas y las poblaciones de células de la placenta aisladas son de origen fetal. Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "de origen fetal" o "de origen no materno" indica que las células de la placenta 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. Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "de origen materno" indica que las células o poblaciones de células se obtienen de estructuras de la placenta asociadas con la madre, p. ej., que tienen el genotipo de la madre. Las células de la placenta aisladas, o poblaciones de células que comprenden las células de la placenta aisladas, pueden comprender células de la placenta aisladas que son de origen únicamente fetal o materno, o puede comprender una población mixta de células de la placenta aisladas de origen tanto fetal como materno. Las células de la placenta aisladas, y las poblaciones de células que comprenden las células de la placenta aisladas, pueden ser identificadas y seleccionadas por las características morfológicas, de los marcadores, y del cultivo descritas a continuación. Las células de la placenta aisladas adecuadas para su uso en los métodos y composiciones descritas en la presente memoria pueden incluir, por ejemplo, las descritos en Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2007/0275362 y en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.468.276.

### 5.3.1 Características físicas y morfológicas

Las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato del cultivo de tejidos, p. ej., la superficie del recipiente de cultivo de tejidos (p. ej., plástico del cultivo de tejidos), o a una superficie de cultivo de tejido recubierta con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (p. ej., nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de la membrana extracelular (p. ej., MATRIGEL®). (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.). Las células de la placenta aisladas en cultivo adoptan una apariencia generalmente fibroblastoide, estrellada, con numerosos 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 de la placenta aisladas muestran un mayor número de estos procesos que los fibroblastos. Morfológicamente, las células de la placenta aisladas son también distinguibles de las células madre hematopoyéticas, que generalmente adoptan una morfología más redondeada, o adoquinada en cultivo.

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

Las células aisladas de la placenta, p. ej., células pluripotentes o células madre, y las poblaciones de células de la placenta aisladas, expresan una pluralidad de marcadores que se pueden utilizar para identificar y/o aislar las células madre, o poblaciones de células que comprenden las células madre. Las células de la placenta aisladas, y las poblaciones de células de la placenta descritas en la presente memoria (es decir, dos o más células de la placenta aisladas) incluyen células de la placenta y poblaciones de células que contienen células de la placenta obtenidas directamente de la placenta, o cualquier parte de la misma (p. ej., amnios, corion, cotiledones placentarios, y similares). Las poblaciones de células de la placenta aisladas también incluyen poblaciones de (es decir, dos o más) células de la placenta aisladas en cultivo, y una población en un recipiente, p. ej., una bolsa. Las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria no son trofoblastos, citotrofoblastos, hemangioblastos, células germinales embrionarias o células madre embrionarias. Las células pluripotentes de la placenta que pueden utilizarse en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2007/0275362 y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 7.045.148 y 7.468.276, cuyas descripciones se exponen a continuación.

Las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, por lo general expresan los marcadores CD73, CD105, CD200, HLA-G, y/u OCT-4, y no expresan CD34, CD38, o CD45, y son HLA-DP<sup>-</sup>, DQ<sup>-</sup> y DR<sup>-</sup>. Las células pluripotentes aisladas son también generalmente CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup> y CD38<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, las células son una o más de SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup> o ABC-p<sup>+</sup>. Las células de la placenta aisladas también pueden expresar HLA-ABC (MHC-1). Estos marcadores se pueden utilizar, en cualquier combinación, para identificar las células de la placenta aisladas, p. ej., las células madre de la placenta aisladas o las células pluripotentes aisladas y para distinguir las células de la placenta aisladas de otros tipos de células. Debido a que las células de la placenta aisladas pueden expresar CD73 y CD105, pueden tener características similares a las de las células madre mesenquimales. La falta de expresión de CD34, CD38 y/o CD45, por ejemplo, identifica las células de la placenta aisladas como células madre no hematopoyéticas.

En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son células madre de la placenta aisladas. En otras ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son células pluripotentes de la placenta aisladas. En una realización, las células de la placenta aisladas son CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> según se detecta por medio de citometría de flujo. En una realización específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, y CD105<sup>+</sup> aisladas son células madre de la placenta. En otra realización específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislada son células de la placenta pluripotentes. En otra realización específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, aislada tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo neural, células de un fenotipo osteogénico, o células de un fenotipo condrogénico. En otra realización específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>,

- CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD45<sup>-</sup> o CD90<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>, según se detecta por medio de citometría de flujo. En una realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aisladas son adicionalmente CD90<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>, según se detecta por medio de citometría de flujo. En otra realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD90<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>, según se detecta por medio de citometría de flujo, es decir, las células son CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, dichas células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> son, adicionalmente, CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>.
- 5
- 10 En una realización específica, cualquiera de las células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> descritas anteriormente es, adicionalmente, una o más de CD29<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> o SH4<sup>+</sup>. En otra realización más específica, las células son adicionalmente CD44<sup>+</sup>. En otra realización específica de cualquiera de las células de la placenta anteriores CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas, las células son, adicionalmente, una o más de CD117, CD133, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, y/o PDL1<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta
- 15 CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> son, adicionalmente, una o más de CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117, CD144/VE-cadherina<sup>baja</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>+</sup> o ligando de muerte programada-1 (PDL1<sup>+</sup>), o cualquier combinación de los mismos. En una realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> son, adicionalmente, CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup>(CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup>(CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117, CD144/VE-cadherina<sup>baja</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, y ligando de muerte programada-1 (PDL1<sup>+</sup>).
- 20
- 25 En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende, p. ej., que está enriquecida en, células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. 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 CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Preferiblemente, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Más preferiblemente, al menos aproximadamente 90%, 95%, o 99% de dichas células son células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En una realización específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> son adicionalmente
- 30 CD90<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>, según se detecta por medio de citometría de flujo. En otra realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD90<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>, según se detecta por medio de citometría de flujo. En una realización más específica, cualquiera de los células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas descritas anteriormente son adicionalmente uno o más de CD29<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> o SH4<sup>+</sup>. En otra realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas, o las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD44<sup>+</sup>. En una realización
- 35
- 40 específica de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células de la placenta CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas anteriores, las células de la placenta aisladas son, adicionalmente, una o más de CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117, CD144/VE-cadherina<sup>baja</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, o ligando de muerte programada-1 (PDL1<sup>+</sup>), o cualquier combinación de los mismos. En una realización más específica, las células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> son, adicionalmente, CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117, CD 144/VE-cadherina<sup>baja</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, y ligando de muerte programada-1 (PDL1<sup>+</sup>).
- 45
- 50 En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son uno o más, o todos, de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, y ABC-p<sup>+</sup>, en donde dichas células de la placenta aisladas se obtienen por rotura física y/o enzimática de tejido de la placenta. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup> y ABC-p<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup>, en donde dichas células de la placenta aisladas tienen al menos una de las siguientes características: CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, y SSEA4<sup>-</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, y SSEA4<sup>-</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, y son o bien SH2<sup>+</sup> o bien SH3<sup>+</sup>. En una realización más específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup>, y son o bien SH2<sup>+</sup> o bien SH3<sup>+</sup>. En otra realización más específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SH2<sup>+</sup>, y SH3<sup>+</sup>. En otra realización más específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, y SSEA4<sup>-</sup>, y son o bien SH2<sup>+</sup> o bien SH3<sup>+</sup>. En otra realización más específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup>, y, o bien SH2<sup>+</sup> o bien SH3<sup>+</sup>, y son al menos uno de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, o SSEA4<sup>-</sup>. En otra realización más específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>,
- 55
- 60

CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, y SSEA4<sup>-</sup>, y, o bien SH2<sup>+</sup> o bien SH3<sup>+</sup>.

5 En una realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son CD200<sup>+</sup> o HLA-G<sup>+</sup>. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son CD200<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup> o HLA-G<sup>+</sup> aisladas facilitan la formación de cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta, que comprende las células de la placenta aisladas, en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas se aíslan de células de la placenta que no son células madre o pluripotentes. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas se aíslan de las células madre de la placenta que no muestran estos marcadores.

10 En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende, p. ej., que se enriquece en, células de la placenta CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>. 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 CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>. Preferiblemente, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son células de la placenta CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>. Más preferiblemente, al menos aproximadamente 90%, 95%, o 99% de dichas células son células de la placenta CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>. En una realización específica de las poblaciones aisladas, dichas células de la placenta también son CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En una realización más específica, dichas células de la placenta también son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización, dicha población de células aisladas produce uno o más cuerpos de tipo embriode, cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En otra realización específica, dicha población de células de la placenta se aísla de células de la placenta que no son células madre. En otra realización específica, dicha población de células de la placenta se aísla de células de la placenta que no muestran estos marcadores.

15 En otra realización, las células de la placenta, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta son HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En una realización más específica, dichas células de la placenta son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> aisladas facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de dichas células de la placenta, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En otra realización específica, dichas células de la placenta se aíslan de células de la placenta que no son células madre. En otra realización específica, dichas células de la placenta se aíslan de las células de la placenta que no muestran estos marcadores.

20 En otra realización, una población de células que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende, p. ej., que se enriquece en, células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aisladas. 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 CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 70% de dichas células en dicha población de células son células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aisladas. En una realización específica de dichas poblaciones, las células de la placenta aisladas son HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En una realización más específica, las células de la placenta aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, dicha población de células produce uno o más cuerpos de tipo embriode, cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En otra realización específica, dicha población de células de la placenta se aísla de células de la placenta que no son células madre. En otra realización específica, dicha población de células madre de la placenta se aísla de las células de la placenta que no muestran estas características.

25 En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas son HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En una realización más específica, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>

aisladas facilitan la producción de uno o más cuerpos de tipo embriode 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 de tipo embriode. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas, se aíslan de células de la placenta que no son las células madre. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas se aíslan de células de la placenta que no muestran estas características.

En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende, p. ej., que se enriquece en, células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>. 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 CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente el 70% de dichas células son dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, o 99% de las células en dicha población de células son dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas. En una realización específica de las poblaciones aisladas, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En una realización más específica, dichas células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, la población de células produce uno o más cuerpos de tipo embriode cuando se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embriode. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de la placenta que no son células de la placenta CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aisladas. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de la placenta que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, las células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas facilitan la formación de cuerpos de tipo embriode 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 de tipo embriode. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas se aíslan de células de la placenta que no son células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas se aíslan de células de la placenta que no muestran estos marcadores.

En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende, p. ej., que se enriquece en, células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup> aisladas. 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 CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de la placenta que no son células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de la placenta que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta aisladas que comprende dichas células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, OCT-4<sup>+</sup>. En una realización más específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta

CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas se aíslan de células de la placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas se aíslan de células de la placenta que no muestran estas características.

5 En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende, p. ej., que se enriquece en, células de la placenta aisladas que son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta aisladas que comprende dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. 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 dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de la placenta que no son dichas células de la placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aisladas. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de la placenta que no muestran estos marcadores.

25 En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son OCT-4<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta aisladas que comprende dichas células cuando se cultivan en condiciones que permiten formación de cuerpos de tipo embriode. En una realización específica, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, o CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas se aíslan de células de la placenta que no son células de la placenta OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas se aíslan de células de la placenta que no muestran estas características.

35 En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende, p. ej., que se enriquece en células de la placenta, aisladas que son OCT-4<sup>+</sup> y facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta aisladas que comprende dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. 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 dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, dichas células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> aisladas son, adicionalmente, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de la placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de la placenta que no muestran estos marcadores.

55 En otras ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son uno o más de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, MHC-1<sup>+</sup> o ABC-p<sup>+</sup>. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, y SH4<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, HLA-1<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup> y ABC-p<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, y SSEA4<sup>-</sup>. En una realización específica,

dichas células de la placenta aisladas OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, y SSEA4<sup>-</sup> son, adicionalmente, CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, y SH4<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son OCT-4<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup>, y SH3<sup>+</sup> o SH4<sup>+</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas son CD34<sup>-</sup> y, o bien CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, o bien OCT-4<sup>+</sup>.

5 En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son células de la placenta CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> aisladas. En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende células de la placenta, en donde al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de dicha población de células son células de la placenta CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. En una realización específica de las realizaciones anteriores, dichas células de la placenta son, adicionalmente, CD90<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>. En una realización específica, dicha célula de la placenta o población de células de la placenta se aísla de células de la placenta que no son células madre. En otra realización específica, dicha célula de la placenta o población de células de la placenta se aísla de células de la placenta que no muestran estas características. En otra realización específica, dicha célula de la placenta aislada no es de origen materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99% de dichas células en dicha población aislada de células de la placenta, no son de origen materno.

20 En otra realización específica de dichas células de la placenta aisladas o poblaciones de células que comprenden las células de la placenta aisladas, dichas células o población se han ampliado, por ejemplo, se han hecho pasar 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 se han hecho proliferar a lo largo de al menos, aproximadamente, o no más de, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 duplicaciones de población. En otra realización específica de las células de la placenta aisladas, o poblaciones de células que comprenden células de la placenta aisladas, que se describen en la presente memoria, dichas células de la placenta aisladas son de origen fetal (es decir, tienen el genotipo fetal).

30 En otra realización, las células de la placenta, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son OCT-4<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de dichas células de la placenta aisladas cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En una realización específica, dichas células de la placenta son CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, o CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta son CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, dichas células de la placenta son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta se aíslan de células de la placenta que no son células madre. En otra realización específica, dichas células de la placenta se aíslan de células de la placenta que no muestran estas características.

40 En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son células de la placenta HLA-A,B,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y CD34<sup>-</sup> aisladas. En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende células de la placenta aisladas, en donde 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 aisladas son células de la placenta HLA-A,B,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y CD34<sup>-</sup> aisladas. En una realización específica, dichas células de la placenta aisladas o población de células de la placenta aisladas se aíslan de células de la placenta que no son células de la placenta HLA-A,B,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y CD34<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas no son de origen materno. En otra realización específica, dicha población de células de la placenta aisladas están sustancialmente libres de componentes maternos; p. ej., 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 de la placenta aisladas no son de origen materno.

50 En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son células de la placenta CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup> aisladas. En otra realización, una población de células que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende células de la placenta aisladas, en donde 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 CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup> aisladas. En una realización específica, dichas células de la placenta aisladas o población de células de la placenta aisladas se aísla de células de la placenta que no son dichas células de la placenta aisladas. En otra realización específica, dichas células de la placenta CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup> aisladas 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 de células de la placenta aisladas, no son de origen materno. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas o población de células de la placenta aisladas se aíslan de células de la placenta que no muestran estas características.

En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son células de la placenta CD10<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, y CD117<sup>-</sup> aisladas. En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende, p. ej., se enriquece en, células de la placenta aisladas, en donde al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de las células en dicha población de células son células de la placenta CD10<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, y CD117<sup>-</sup> aisladas. En una realización específica, dicha célula de la placenta aislada o población de células de la placenta aisladas se aísla de células de la placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células de la placenta 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, dicha célula de la placenta aislada o población de células de la placenta aisladas se aísla de células de la placenta que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son células de la placenta CD10<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, y CD117<sup>-</sup> aisladas. En otra realización, una población de células útil, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende, p. ej., se enriquece en, células de la placenta CD10<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, y CD117<sup>-</sup> aisladas en donde 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<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, y CD117<sup>-</sup>. En una realización específica, dichas células de la placenta aisladas o población de células de la placenta aisladas se aíslan de células de la placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células de la placenta 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 de la placenta aisladas o población de células de la placenta aisladas se aíslan de células de la placenta que no muestran estas características.

En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son HLA A,B,C<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, y CD133<sup>-</sup>, y son, adicionalmente, CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y/o HLA-G<sup>+</sup>, y/o negativas para CD 117. En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, es una población de células que comprende células de la placenta aisladas, en donde al menos aproximadamente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90 %, 95%, 98% o aproximadamente 99% de las células en dicha población son células de la placenta aisladas que son HLA A,B,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, y que son, adicionalmente, positivas para CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 y/o HLA-G, y/o negativas para CD117. En una realización específica, dichas células de la placenta aisladas o población de células de la placenta aisladas se aíslan de células de la placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células de la placenta 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 de la placenta aisladas o población de células de la placenta aisladas se aíslan de las células de la placenta que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son células de la placenta aisladas que son CD200<sup>+</sup> y CD10<sup>+</sup>, como se determina por la unión del anticuerpo, y CD117<sup>-</sup>, como se determina tanto por la unión anticuerpo como por RT-PCR. En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son células de la placenta aisladas, por ejemplo, células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, que son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, HLA de clase I y β-2-microglobulina<sup>-</sup>. En otra realización, las células de la placenta aisladas, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son células de la placenta en donde la expresión de al menos un marcador celular es al menos dos veces mayor que para una célula madre mesenquimal (p. ej., una célula madre mesenquimal derivadas de médula ósea). En otra realización específica, dichas células de la placenta 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 de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son células de la placenta aisladas, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, que son uno o más de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62-E<sup>-</sup>, CD62-L<sup>-</sup>, CD62-P<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD104<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD144/VE-cadherina<sup>baja</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, β2-microglobulina<sup>baja</sup>, MHC-I<sup>baja</sup>, MHC-II<sup>-</sup>, HLA-G<sup>baja</sup>, y/o PDL1<sup>baja</sup>. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son, al menos, CD29<sup>+</sup> y CD54<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son, al menos, CD44<sup>+</sup> y CD106<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son al menos CD29<sup>+</sup>.

- 5 En otra realización, una población de células, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, se compone de células de la placenta aisladas, y al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de la células de dicha población de células son células de la placenta aisladas que son uno o más de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62-E<sup>-</sup>, CD62-L<sup>-</sup>, CD62-P<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD104<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD144/VE-cadherina<sup>baja</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, β2-microglobulina<sup>baja</sup>, MHC-I<sup>baja</sup>, MHC-II<sup>-</sup>, HLA-G<sup>baja</sup>, y/o PDL1<sup>baja</sup>. En una realización más específica, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicha población de células son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62-E<sup>-</sup>, CD62-L<sup>-</sup>, CD62-P<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD104<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD144/VE-cadherina<sup>baja</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, β2-microglobulina<sup>baja</sup>, MHC-I<sup>baja</sup>, MHC-II<sup>-</sup>, HLA-G<sup>baja</sup>, y PDL1<sup>baja</sup>.
- 10 En ciertas realizaciones de células de la placenta aisladas, dichas células de la placenta aisladas no se diferencian durante el cultivo en medio de crecimiento, es decir, medio formulado para promover la proliferación, p. ej., durante la proliferación en medio de crecimiento. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas no requieren una capa de alimentación para proliferar. En otra realización específica, dichas células de la placenta aisladas no se diferencian en cultivo en ausencia de una capa de alimentación, únicamente a causa de la falta de
- 15 una capa de células de alimentación.
- En otra realización, las células, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, son células de la placenta aisladas, en donde una pluralidad de dichas células de la placenta aisladas son positivas para aldehído deshidrogenasa (ALDH), tal como se evaluó mediante un análisis de actividad de aldehído deshidrogenasa. Tales análisis son conocidos en la técnica (véase, p. ej., Bostian y Betts, Biochem. J.,
- 20 173, 787, (1978)). En una realización específica, dicho análisis de ALDH utiliza ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregon) como un marcador de la actividad 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 la presente memoria una población de células aisladas del cordón umbilical, p. ej., células de cordón umbilical aisladas pluripotentes, en donde una pluralidad de dichas células del cordón umbilical aisladas son positivas para aldehído deshidrogenasa, tal como se evalúa por un análisis de actividad de aldehído
- 25 deshidrogenasa que utiliza ALDEFLUOR® como un indicador de la actividad 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, dicha población de células de la placenta aisladas o células de cordón umbilical aisladas muestra una actividad ALDH al menos tres veces, o al menos cinco veces, más alta que una población de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea que tiene aproximadamente el mismo número de células y se cultiva en las mismas condiciones.
- 30 En otra realización específica de dichas células de la placenta aisladas o poblaciones de células que comprenden las células de la placenta aisladas, dichas células o población se han ampliado, por ejemplo, se trasladaron 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 proliferaron por lo menos, sobre, o no más de, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 duplicaciones de población. En otra realización específica de las células de la placenta aisladas, o poblaciones de células que comprenden células de la placenta aisladas, que se dan a conocer en la presente memoria, dichas células de la placenta aisladas son de origen fetal (es decir, tienen el genotipo fetal).
- 35 En una realización específica de cualquiera de las células de la placenta aisladas o poblaciones de células de la placenta aisladas anteriores, 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 de la placenta o poblaciones de células anteriores, las células, o células en la población de células, no son de origen materno.
- 40 Las células de la placenta aisladas, o poblaciones de células de la placenta aisladas, que llevan cualquiera de las combinaciones de los marcadores anteriores, se pueden combinar en cualquier proporción. Cualquiera de dos o más de las poblaciones de células de la placenta aisladas anteriores se puede 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 de la placenta aisladas definida por una de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente, y una segunda población de células de la placenta aisladas definida por otra de las
- 45 combinaciones de marcadores descritas anteriormente, en donde dichas primera y segunda poblaciones se combinan en una proporción de aproximadamente 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, o aproximadamente 99:1. De la misma manera, se pueden combinar tres, cuatro, cinco o más cualesquiera de las células de la placenta aisladas o poblaciones de células de la placenta aisladas descritas anteriormente.
- 50 Las células de la placenta aisladas, que se pueden utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, se pueden obtener, p. ej., por la rotura de tejido placentario, con o sin digestión enzimática (véase la Sección 5.4.3) o perfusión (véase la Sección 5.4.4). Por ejemplo, las poblaciones de células de la placenta aisladas pueden ser producidas de acuerdo con un método que comprende perfundir una placenta de mamífero cuya sangre se ha drenado del cordón umbilical y perfundido para eliminar la sangre residual; perfundir dicha placenta con una solución de perfusión; y recoger dicha solución de perfusión, en donde dicha solución de perfusión después de la perfusión comprende una población de células de la placenta que comprende células de la placenta
- 55
- 60

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 hace pasar a través tanto de la vena umbilical como de las arterias umbilicales y se recoge después de que exude de la placenta. En otra realización específica, la solución de perfusión se hace pasar a través de la vena umbilical y se recoge de las arterias umbilicales, o se hace pasar a través de las arterias umbilicales y se recoge de la vena umbilical.

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

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria una composición que comprende una población de células de la placenta aisladas, como se describe en la presente memoria, recogidas por perfusión, en donde 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 células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria se pueden producir mediante la digestión de tejido de la placenta con una enzima que desorganiza el tejido para obtener una población de células de la placenta, que comprende las células, y el aislamiento de, o el aislamiento sustancial, de una pluralidad de células de la placenta del resto de dichas 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 la presente memoria. En realizaciones específicas, por ejemplo, dicho tejido de la placenta puede ser toda una placenta, una membrana amniótica, corion, una combinación de amnios y corion, o una combinación de cualquiera de los anteriores. En otra realización específica, la enzima que desorganiza el tejido es tripsina o colagenasa. En diversas realizaciones, las células de la placenta 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.

El perfilado de genes confirma que las células de la placenta aisladas, y las poblaciones de células de la placenta aisladas, se distinguen de otras células, p. ej., células madre mesenquimales, p. ej., células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. Las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria se pueden distinguir, p. ej., de las células madre mesenquimales basándose en la expresión de uno o más genes, cuya expresión es significativamente más alta en las células de la placenta aisladas, o en ciertas células madre del cordón umbilical aisladas, en comparación con las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. En particular, las células de la placenta aisladas, que se puede utilizar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria, se pueden distinguir de las células madre mesenquimales basándose en la expresión de uno o más genes, cuya expresión 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 médula ósea, en donde 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, p. ej., la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2007/0275362. En una realización más específica, dichas células de la placenta aisladas expresan dichos uno o más genes cuando se cultivan durante aproximadamente 3 a aproximadamente 35 duplicaciones de la población en un medio que comprende DMEM-LG (Gibco); suero de ternera fetal al 2% (Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona  $10^{-9}$  M (Sigma); ácido ascórbico 2-fosfato  $10^{-4}$  M (Sigma); factor de crecimiento epidérmico de 10 ng/ml (R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) de 10 ng/ml (R & D Systems). En una realización específica, el gen específico de células de la placenta aisladas o específico de células de cordón umbilical aisladas es CD200.

Las 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 (IL6), 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 (SLC12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN), y BC005001 (ZC3H12A) de Marzo de 2008.

En una realización más específica, dichas células de la placenta 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 detectablemente mayor que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, cuando se cultivan las células en condiciones equivalentes.

En realizaciones más específicas, las poblaciones de células de la placenta se pueden seleccionar mediante la selección de células de la placenta que expresan uno o más genes en un nivel detectablemente mayor que una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea, en donde dichos uno o más genes se seleccionan del grupo que consiste en ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, y ZC3H12A, y en donde dichas células madre derivadas de la médula ósea han sido objeto de una serie de pases en cultivo equivalente al número de pases que ha experimentado dicha célula de la placenta. En una realización más específica, dicha selección comprende seleccionar células que expresan ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A a un nivel detectablemente mayor que una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea.

La expresión de los genes mencionados anteriormente se puede evaluar por medio de técnicas convencionales. Por ejemplo, las sondas basadas en la secuencia del gen o los genes se pueden seleccionar individualmente y construir por medio de técnicas convencionales. La expresión de los genes se puede evaluar, p. ej., en una micromatriz que comprende sondas para uno o más de los genes, p. ej., una matriz Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133A 2.0, o Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133 Plus 2.0 (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 se pueden generar fácilmente utilizando técnicas convencionales bien conocidas.

El nivel de expresión de estos genes se puede utilizar para confirmar la identidad de una población de células de la placenta aisladas, para identificar una población de células que comprende al menos una pluralidad de células de la placenta aisladas, o similares. Las poblaciones de células de la placenta aisladas, cuya identidad se confirma, puede ser clonal, p. ej., las poblaciones de células de la placenta aisladas ampliadas a partir de una única célula de la placenta aislada, o una población mixta de células madre, p. ej., una población de células que comprende únicamente células de la placenta aisladas que se amplían a partir de múltiples células de la placenta aisladas, o una población de células que comprende células de la placenta aisladas, como se describe en la presente memoria, 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, p. ej., células ampliadas 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 células madre mesenquimales. Tal selección puede ser de una población de una pluralidad de poblaciones de células de la placenta aisladas, de una pluralidad de poblaciones de células, cuya identidad no se conoce, etc.

Las células de la placenta aisladas se pueden seleccionar basándose en el nivel de expresión de uno o más de dichos genes en comparación con el nivel de expresión en dichos uno o más genes, p. ej., un control de células madre mesenquimales, por ejemplo, el nivel de expresión en dichos uno o más genes en un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. En una realización, el nivel de expresión de dichos uno o más genes en una muestra que comprende un número equivalente de células madre mesenquimales se utiliza como control. En otra realización, el control, para células de la placenta aisladas sometidas a ensayo bajo ciertas condiciones, es un valor numérico que representa el nivel de expresión de dichos uno o más genes en las células madre mesenquimales en dichas condiciones.

Las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria muestran las características anteriores (p. ej., combinaciones de marcadores de la superficie celular y/o perfiles de expresión génica) en cultivo primario, o durante la proliferación en medio que comprende, p. ej., DMEM-LG (Gibco), suero de ternera fetal (FCS) al 2% (Hyclone Laboratories), 1x insulina-transferrina-selenio (ITS), 1x ácido linolénico-albúmina de suero bovino (LA-BSA), dexametasona  $10^{-9}$  M (Sigma), ácido ascórbico-2-fosfato  $10^{-4}$  M (Sigma), factor de crecimiento epidérmico (EGF) de 10 ng/ml (R & D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) de 10 ng/ml (R & D Systems), y 100 U de penicilina/1000 U de estreptomina.

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

placenta aisladas. Las poblaciones de células de la placenta aisladas que se pueden usar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria comprenden al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de células de la placenta aisladas viables, según se determina, por ejemplo, mediante exclusión de azul de tripán.

### 5 5.3.3 Crecimiento en cultivo

El crecimiento de las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria, como para cualquier célula de mamífero, depende en parte del medio particular seleccionado para el crecimiento. En condiciones óptimas, las células de la placenta aisladas normalmente duplican su número en 3-5 días. Durante el cultivo, las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria se adhieren a un sustrato en cultivo, p. ej., la superficie de un recipiente de cultivo de tejidos (p. ej., plástico de la placa de cultivo de tejidos, plástico recubierto de fibronectina, y similares) y forman una monocapa.

Las poblaciones de células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria, cuando se cultivan en condiciones apropiadas, forman cuerpos de tipo embriode, es decir, agrupaciones tridimensionales de células que crecen encima de la capa de células madre adherentes. Las células dentro de los cuerpos de tipo embriode expresan marcadores asociados con células madre muy temprano, p. ej., OCT-4, Nanog, SSEA3 y SSEA4. Las células dentro de los cuerpos de tipo embriode no suelen ser adherentes al sustrato de cultivo, al igual que las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria, pero permanecen ancladas a las células adherentes durante el cultivo. Las células de los cuerpos de tipo embriode dependen de las células de la placenta aisladas adherentes para la viabilidad, ya que los cuerpos de tipo embriode no se forman en ausencia de células de la placenta aisladas adherentes. De ese modo, las células de la placenta aisladas adherentes facilitan el crecimiento de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprende las células de la placenta aisladas adherentes. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que las células de los cuerpos de tipo embriode crecen sobre las células de la placenta aisladas adherentes tanto como crecen las células madre embrionarias sobre una capa de células de alimentación. Las células madre mesenquimales, p. ej., células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, no desarrollan cuerpos de tipo embriode en cultivo.

### 5.3.4 Células madre de la placenta hematopoyéticas

En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas son células de la placenta CD34<sup>+</sup>, p. ej., células de la placenta hematopoyéticas. Tales células CD34<sup>+</sup> no están, sin embargo, comprendidas en el término "pluripotentes" según se utiliza en la presente memoria. Tales células se pueden obtener a partir de tejido de la placenta, p. ej., a partir de una placenta cuya sangre se ha drenado del cordón umbilical y se ha perfundido para eliminar la sangre residual. En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas CD34<sup>+</sup> son CD38<sup>-</sup>. En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas CD34<sup>+</sup> son CD38<sup>+</sup>. En otras ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas CD34<sup>+</sup> son CD45<sup>+</sup>. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>+</sup>.

### 5.3.5 Células de líquido perfundido de la placenta

En ciertas realizaciones, las células de las composiciones proporcionadas en la presente memoria, formuladas por medio de los métodos proporcionados en la presente memoria, son células obtenidas de líquido perfundido de la placenta. Según se utiliza en la presente memoria, "células obtenidas de líquido perfundido de la placenta" incluye células nucleadas totales obtenidas a partir de, p. ej., aisladas de, líquido perfundido de placenta, un subconjunto de las células nucleadas obtenidas de líquido perfundido de la placenta, o células cultivadas o que han proliferado a partir de células obtenidas directamente de líquido perfundido de la placenta. El líquido perfundido de la placenta se puede obtener a partir de una placenta cuya sangre se ha drenado del cordón umbilical y se ha perfundido para eliminar la sangre residual, antes de la perfusión para obtener células de la placenta. El líquido perfundido de la placenta se puede obtener a partir de una placenta cuya sangre se ha drenado del cordón umbilical, pero no se ha perfundido para eliminar la sangre residual. El líquido perfundido de la placenta se puede obtener a partir de una placenta cuya sangre no ha sido ni drenada del cordón umbilical ni perfundida para eliminar la sangre residual. En las dos últimas realizaciones, las células de la placenta, p. ej., las células nucleadas de líquido perfundido de la placenta, por ejemplo, las células nucleadas totales del líquido perfundido de la placenta, comprenden células nucleadas de la sangre de la placenta y/o sangre del cordón. Los métodos para obtener el líquido perfundido de la placenta, y las células del líquido perfundido de la placenta, se describen en la Sección 5.4.4, a continuación.

## 50 5.4 Métodos para obtener células de la placenta aisladas

### 5.4.1 Composición de recogida de células madre

Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos de recogida y aislamiento de células de la placenta p. ej., las células de la placenta aisladas descritas en la Sección 5.2, más arriba. Generalmente, tales células se obtienen a partir de una placenta de mamífero utilizando una solución fisiológicamente aceptable, p. ej., una composición de recogida de células madre. Una composición de la recogida de células se describe en detalle en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 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, p. ej., las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria, por ejemplo, una solución salina (p. ej., solución salina tamponada con fosfato, solución de Krebs, solución de Krebs modificada, solución de Eagle, NaCl al 0,9%. etc.), un medio de cultivo (p. ej., DMEM, H.DMEM, etc.), y similares.

- 5 La composición de recogida de células puede comprender uno o más componentes que tienden a conservar las células de la placenta aisladas, es decir, evitar que las células de la placenta aisladas mueran, o retrasar la muerte de las células de la placenta aisladas, reducir el número de células de la placenta aisladas en una población de células que mueren, o similar, desde el momento de la recogida hasta el momento del cultivo. Tales componentes pueden ser, p. ej., un inhibidor de la apoptosis (p. ej., un inhibidor de caspasa o un inhibidor de JNK); un  
10 vasodilatador (p. ej., 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 (p. ej., 2-(1H-Indol-3-Il)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina, o clonazepam); un inhibidor de TNF- $\alpha$ ; y/o un perfluorocarbono de transporte de oxígeno (p. ej., bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo,  
15 etc.).

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

- 20 La composición de recogida de células puede comprender una cantidad eficaz como bactericida o bacteriostático de un antibiótico. El antibiótico puede ser un macrólido (p. ej., tobramicina), una cefalosporina (p. ej., cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxil), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (p. ej., penicilina V) o una quinolona (p. ej., ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomina, etc. El antibiótico puede ser activo contra bacterias Gram (+) y/o (Gram (-), p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y similares.  
25

- 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 dalton, p. ej., presente en una cantidad suficiente para mantener  
30 la integridad endotelial y la viabilidad celular (p. ej., un coloide de origen natural o sintético, un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (p. ej., hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presentes de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 100 mM); un agente reductor (p. ej., N-acetilcisteína presente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente  
35 que impide la entrada de calcio en las células (p. ej., verapamilo presente de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 25 mM); nitroglicerina (p. ej., de aproximadamente 0,05 g/L a aproximadamente 0,2 g/L); un anticoagulante, p. ej., presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de la sangre residual (p. ej., heparina o hirudina presentes a una concentración de aproximadamente 1.000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (p. ej., amilorida, etil isopropil  
40 amilorida, hexametilén amilorida, dimetil amilorida o isobutil amilorida presentes de aproximadamente 1,0 M a aproximadamente 5 mM).

#### 5.4.2 Recogida y manipulación de la placenta

- En general, la placenta humana se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento. La placenta se recupera preferiblemente de una paciente después del consentimiento informado y después de recoger un historial  
45 clínico completo de la paciente y asociarlo con la placenta. Preferiblemente, el historial médico continúa después del parto. Un historial médico de este tipo puede ser utilizado para coordinar el uso posterior de la placenta o las células madre recolectadas de la misma. Por ejemplo, las células madre de la placenta humana pueden ser utilizadas, a la luz del historial clínico, para la medicina personalizada para el recién nacido asociado a la placenta, o para los padres, hermanos u otros parientes del recién nacido.

- 50 Antes de la recuperación de las células de la placenta aisladas, se eliminan la sangre del cordón umbilical y la sangre de la placenta. Después del parto, se recupera la sangre del cordón umbilical de la placenta. La placenta se puede someter a un proceso de recuperación de sangre de cordón convencional. Típicamente se utiliza una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para desangrar la placenta (véanse, p. ej., Anderson, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.372.581; Hessel et al., Patente de Estados Unidos Núm. 5.415.665). La aguja o cánula se colocan  
55 generalmente en la vena umbilical y la placenta puede ser masajeadada suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón de la placenta. Semejante recuperación de sangre del cordón umbilical se puede realizar de manera comercial, p. ej., LifeBank USA, Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell. Preferiblemente, la placenta es drenada por gravedad sin manipulación adicional con el fin de minimizar la desorganización del tejido durante la recuperación de sangre del cordón.

Típicamente, una placenta es transportada desde la sala de partos o alumbramientos a otra ubicación, p. ej., un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y la recogida de las células madre, p. ej., por medio de perfusión o 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 proximal sujeto con unas pinzas, en una bolsa de plástico con cierre de cremallera estéril, que se coloca a continuación en un recipiente aislado. Alternativamente, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre de cordón sustancialmente como se describe en la Patente de los Estados Unidos pendiente Núm. 7.147.626. Preferiblemente, la placenta se entrega al laboratorio de cuatro a veinticuatro horas después del parto. Por ejemplo, el cordón umbilical proximal se sujeta con pinzas, preferiblemente a 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco de la placenta antes de la recuperación de sangre del cordón. Alternativamente, el cordón umbilical proximal se sujeta con pinzas después de la recuperación de sangre del cordón, pero antes del procesamiento adicional de la placenta.

La placenta se puede almacenar, antes de la recogida de células, en condiciones estériles y a la temperatura ambiente o a una temperatura de 5-25°C (grados centígrados). La placenta se puede conservar 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. Preferiblemente, la placenta se recoge entre aproximadamente cero horas y aproximadamente dos horas después de la expulsión. La placenta se almacena preferiblemente en una solución anticoagulante a una temperatura de 5-25°C (grados centígrados). Las soluciones anticoagulantes adecuadas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar una solución de heparina o warfarina sódica. Preferiblemente, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (p. ej., al 1% p/p en solución 1:1000). La placenta desangrada se almacena preferiblemente durante 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 recogidas y preparadas generalmente como anteriormente, pueden ser tratadas de cualquier manera conocida en la técnica, p. ej., pueden ser perfundidas o rotas, p. ej., digeridas con una o más enzimas de rotura de tejido, para obtener células de la placenta aisladas.

#### 5.4.3 Rotura física y digestión enzimática del tejido de la placenta

Las células madre se pueden recoger de una placenta de mamífero por rotura física de parte o de la totalidad del órgano. Por ejemplo, la placenta, o una porción de la misma, pueden ser, p. ej., trituradas, cortadas, picadas, cortadas en cubitos, picadas, maceradas o similares. El tejido se puede cultivar a continuación para obtener una población de células de la placenta aisladas. Típicamente, el tejido de la placenta se rompe utilizando, p. ej., una composición de recogida de células de la placenta (véase la Sección 5.2 y más abajo).

La placenta puede ser diseccionada en componentes antes de la rotura física y/o la digestión enzimática y la recuperación de las células madre. Las células madre de la placenta se pueden obtener a partir de la totalidad o de una porción de la membrana amniótica, corion, cordón umbilical, cotiledones de la placenta, o cualquier combinación de los mismos, incluso de toda una placenta. Preferiblemente, las células de la placenta aisladas se obtienen a partir de tejido de la placenta que comprende amnios y corion. Típicamente, las células de la placenta aisladas se pueden obtener por la rotura de un pequeño bloque de tejido de la placenta, p. ej., un bloque de tejido de la placenta que tiene un volumen de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o aproximadamente 1000 milímetros cúbicos. Se puede utilizar cualquier método de rotura física, siempre que el método de rotura deje una pluralidad, más preferiblemente una mayor parte, y más preferiblemente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% de las células de dicho órgano viables, como se determina, p. ej., por medio de exclusión de azul de tripan.

Las células madre generalmente se pueden recoger de una placenta, o una porción de la misma, 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.

El tejido roto se puede cultivar en un medio de cultivo de tejido adecuado para la proliferación de células de la placenta aisladas (véase, p. ej., la Sección 5.5, más abajo, que describe el cultivo de células de la placenta aisladas).

Alternativamente, la placenta aislada se recoge por rotura física del tejido de la placenta, en donde la rotura física incluye la digestión enzimática, que se puede lograr mediante el uso de una o más enzimas de digestión de tejido. La placenta, o una porción de la misma, también se pueden romper físicamente y digerir con una o más enzimas, y el material resultante se sumerge a continuación en, o se mezcla en, una composición de recogida de células.

Una composición de recogida de células preferida comprende una o más enzimas de rotura de tejidos. La digestión enzimática utiliza preferiblemente una combinación de enzimas, p. ej., una combinación de una metaloproteasa de la matriz y una proteasa neutra, por ejemplo, una combinación de colagenasa y dispasa. Por ejemplo, la digestión enzimática de tejido de la placenta utiliza una combinación de una metaloproteasa de la matriz, una proteasa neutra, y una enzima mucolítica para la digestión del ácido hialurónico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa, y hialuronidasa o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.) y hialuronidasa.

Otras enzimas que se pueden utilizar para romper el tejido de la placenta incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina, o elastasa. Las serina proteasas pueden ser inhibidas por la alfa 2 microglobulina del suero y, por tanto, el medio utilizado para la digestión está por lo general libre de suero. Comúnmente se utilizan EDTA y ADNasa en los procedimientos de digestión enzimática para aumentar la eficacia de la recuperación celular. El producto digerido se diluye preferiblemente con el fin de evitar que las células queden atrapadas dentro del producto digerido viscoso.

Se puede utilizar cualquier combinación de enzimas de digestión de tejido. Las concentraciones típicas para las enzimas de digestión de tejido incluyen, p. ej., de 50 a 200 U/ml para la colagenasa I y la colagenasa IV, de 1 a 10 U/ml para la dispasa, y de 10 a 100 U/ml para la elastasa. Las proteasas se pueden utilizar combinadas, 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, p. ej., células madre de la placenta y células pluripotentes de la placenta. Por ejemplo, una placenta, o porción de la misma, se digiere primero con una cantidad apropiada de colagenasa I de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 mg/ml durante, p. ej., 30 minutos, seguido de digestión con tripsina, a una concentración de aproximadamente 0,25%, durante, p. ej., 10 minutos, a 37°C. Las serina proteasas se utilizan preferiblemente de manera consecutiva después del uso de otras enzimas.

Alternativamente, el tejido puede ser roto adicionalmente por la adición de un quelante, p. ej., ácido etilenglicol-bis(éter 2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la composición de recogida de células de la placenta, o a una solución en la que el tejido se rompe y/o digiere antes del aislamiento de las células de la placenta con la composición de recogida de células de la placenta.

Después de la digestión, el producto digerido se lava, por ejemplo tres veces, con medio de cultivo, y las células lavadas se siembran en frascos de matraces de cultivo. Las células se aíslan a continuación mediante adherencia diferencial, y se caracterizan por, p. ej., la viabilidad, los marcadores de superficie celular, la diferenciación, y similares.

Se apreciará que, cuando toda una placenta, o una parte de una placenta que comprenden células tanto fetales como maternas (por ejemplo, cuando la porción de la placenta comprende el corion o los cotiledones), las células de la placenta recogidas comprenderán una mezcla de células de la placenta, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, derivadas de fuentes tanto fetales como maternas. Cuando una parte de la placenta que no comprende, o comprende un número insignificante de, células maternas (por ejemplo, amnios), las células de la placenta recogidas comprenderán células de la placenta casi exclusivamente fetales, p. ej., células madre de la placenta fetales o células pluripotentes de la placenta fetales.

Las células de la placenta se pueden aislar a partir de tejido roto por tripsinización diferencial (véase la Sección 5.4.5, a continuación) seguido de cultivo en uno o más nuevos recipientes de cultivo en medio de proliferación de nueva aportación, seguido opcionalmente por una segunda etapa de tripsinización diferencial.

#### 5.4.4 Perfusión de la placenta

Las células de la placenta, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, también se pueden obtener por perfusión de placenta de mamífero. Los métodos de perfusión de la placenta de mamífero para obtener células de la placenta se describen, p. ej., en Hariri, Patentes de Estados Unidos Núms. 7.045.148 y 7.255.729 y en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos relacionada No. 2007/0190042.

Las células de la placenta se pueden recoger por perfusión, p. ej., a través de la vasculatura de la placenta, utilizando, p. ej., una composición de recogida de células como solución de perfusión. Por ejemplo, una placenta de mamífero es perfundida haciendo pasar la solución de perfusión a través de una o ambas de la arteria umbilical y la vena umbilical. El flujo de la solución de perfusión a través de la placenta se puede realizar utilizando, p. ej., el flujo por gravedad en la placenta. Preferiblemente, se hace que la solución de perfusión pase a través de la placenta por medio de una bomba, p. ej., una bomba peristáltica. La vena umbilical puede ser, p. ej., canulada con una cánula, p. ej., una cánula de TEFLON<sup>®</sup> o de plástico, que está conectada con un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión.

En la preparación para la perfusión, la placenta se orienta preferiblemente (p. ej., se suspende) de una manera tal que la arteria umbilical y la vena umbilical se encuentran 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 mediante el paso de un fluido de perfusión a la vena umbilical y la recogida desde las arterias umbilicales, o el paso de un fluido de perfusión a las arterias umbilicales y la recogida desde la vena umbilical.

Por ejemplo, la arteria umbilical y la vena umbilical se conectan de forma simultánea, p. ej., 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 hace pasar a la vena y la arteria umbilicales. 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 se adjunta 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 dejar que fluya o se filtre fuera de las

aberturas en la pared de la placenta que conectan con la pared del útero materno. Las células de la placenta que son recogidas por este método, que se puede denominar método "pan", son típicamente una mezcla de células fetales y maternas.

5 Por ejemplo, la solución de perfusión se hace pasar a través de las venas umbilicales y se recoge 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.

10 Se apreciará que la perfusión utilizando el método pan, es decir, por el que se recoge el líquido perfundido después de que haya exudado desde el lado materno de la placenta, da como resultado una mezcla de células fetales y maternas. Como resultado, las células recogidas por este método comprenden una población mixta de células de la placenta, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, de origen tanto fetal como materno. En contraste, la perfusión únicamente a través de la vasculatura de la placenta en el método de circuito cerrado, por el que se hace pasar el fluido de perfusión a través de uno o dos vasos de la placenta y se recoge únicamente a través del vaso o los vasos restantes, da como resultado la recogida de una población de células de la placenta casi exclusivamente de origen fetal.

15 El método de perfusión de circuito cerrado se puede realizar como sigue. Se obtiene una placenta después del parto en el plazo de aproximadamente 48 horas después del nacimiento. El cordón umbilical se pinza y se corta por encima de la pinza. El cordón umbilical se puede descartar, o se puede procesar para recuperar, p. ej., células madre del 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, p. ej., utilizando una disección roma con los dedos. Si la membrana amniótica se separa del corion antes de la perfusión, ésta puede ser, p. ej., desechada, o procesada, p. ej., para obtener células de la placenta mediante digestión enzimática, o para producir, p. ej., un biomaterial de membrana amniótica, p. ej., el biomaterial descrito en la Publicación de la Solicitud de los Estados Unidos Núm. 2004/0048796. Después de limpiar la placenta de todos los coágulos de sangre visibles y de sangre residual, p. ej., utilizando una gasa estéril, los vasos del cordón umbilical se exponen, p. ej., cortando parcialmente la membrana del cordón umbilical para exponer una sección transversal del cordón. Los vasos se identifican, y se abren, p. ej., haciendo avanzar una pinza cocodrilo cerrada a través del extremo de corte de cada recipiente. El aparato, p. ej., un tubo de plástico conectado a un dispositivo de perfusión o bomba peristáltica, se inserta a continuación en cada una de las arterias de la placenta. La bomba puede ser cualquier bomba adecuada para el propósito, p. ej., una bomba peristáltica. El tubo de plástico, conectado a un depósito de recogida estéril, p. ej., una bolsa de sangre, tal como una bolsa de recogida de 250 ml, se inserta después en la vena de la placenta. Alternativamente, el tubo conectado a la bomba se inserta en la vena de la placenta, y los tubos para uno o varios depósitos de recogida se insertan en una o ambas arterias de la placenta. La placenta se perfunde a continuación con un volumen de solución de perfusión, p. ej., aproximadamente 750 ml de solución de perfusión. Las células en el líquido perfundido se recogen a continuación, p. ej., por centrifugación.

20 La perfusión p. ej., para recoger las células de líquido perfundido de la placenta, se puede realizar como sigue. La placenta o las placentas que contienen sangre de la placenta se perfunden solamente a través de la vasculatura de la placenta mediante el bombeo de NaCl estéril al 0,9% (p. ej., aproximadamente 750 ml) utilizando, p. ej., una bomba peristáltica, y el líquido perfundido resultante se recoge en una bolsa de recogida. Las células del líquido perfundido se recogen por centrifugación, p. ej., a aproximadamente 420 g, seguido de la eliminación del exceso de sobrenadante (NaCl, plasma, anticoagulante). A continuación se añade a las células del líquido perfundido hetalmidón para obtener una dilución al 30%. Las células del líquido perfundido se colocan de nuevo en un extractor de plasma, p. ej., durante aproximadamente una hora, para separar los eritrocitos. El plasma y las células nucleadas resultantes se separan de la bolsa de recogida, y se colocan de nuevo en un extractor de plasma. Las células restantes se resuspenden en albúmina de suero humano al 5% en un volumen final de aproximadamente 20 ml. Se añaden DMSO/PLASMALYTE A® (1:1 v/v) premezclados para obtener un volumen de aproximadamente 24 ml. Las células resultantes son criopreservadas. En aspectos específicos de este método, se drena la sangre del cordón umbilical de la placenta a partir del cual se obtiene el líquido perfundido, pero no se perfunde, antes de la perfusión para recoger las células de la placenta. Alternativamente, la placenta a partir de la cual se obtiene el líquido perfundido se vacía de sangre del cordón umbilical, y se perfunde para eliminar la sangre residual, antes de la perfusión para recoger células de la placenta.

Por ejemplo, el cordón umbilical proximal se sujeta con una pinza durante la perfusión, y más preferiblemente, se sujeta con una pinza a 4-5 cm (centímetros) de la inserción del cordón en el disco de la placenta.

55 El volumen de líquido de perfusión utilizado para recoger células de la placenta puede variar en función del número de células que se vaya a recoger, del tamaño de la placenta, del número de recogidas que se vaya a realizar de una sola placenta, etc. El volumen de líquido perfundido puede ser de 50 ml a 5000 ml, de 50 ml a 4000 ml, de 50 ml a 3000 ml, de 100 ml a 2000 ml, de 250 ml a 2000 ml, de 500 ml a 2000 ml o de 750 ml a 2000 ml. Por lo general, la placenta se perfunde con 700-800 ml de líquido de perfusión tras el desangrado.

60 La placenta se puede perfundir una pluralidad de veces durante el curso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se va a perfundir una pluralidad de veces, se puede mantener o cultivar en condiciones asépticas en un

5 contenedor u otro recipiente adecuado, y perfundir con la composición de recogida de células, o una solución de perfusión convencional (p. ej., una solución salina normal, tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (p. ej., heparina, warfarina sódica, cumarina, bishidroxicumarina), y/o con o sin un agente antimicrobiano (p. ej.,  $\beta$ -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomina (p. ej., de 40 a 100  $\mu\text{g/ml}$ ), penicilina (p. ej., a 40 U/ml), anfotericina B (p. ej., a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Por ejemplo, una placenta aislada se mantiene o se cultiva durante un período de tiempo sin recoger el líquido perfundido, de tal 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 recogida de líquido perfundido. La placenta perfundida se puede mantener una o más veces adicionales, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más horas, y perfundir una segunda vez, p. ej., con 700-800 ml fluido de perfusión. La placenta se puede perfundir 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 horas. Preferiblemente, la perfusión de la placenta y la recogida de la solución de perfusión, p. ej., composición de recogida de células, se repiten hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los líquidos de perfusión en diferentes puntos temporales se pueden seguir procesando de forma individual para recuperar las poblaciones dependientes del tiempo de las células, p. ej., células madre. Los líquidos de perfusión de diferentes puntos de tiempo también pueden ser combinados. Preferiblemente, las células madre se recogen de una vez o en momentos entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 18 horas después de la expulsión.

20 La perfusión da como resultado preferiblemente la recogida de significativamente más células de la placenta que el número que se puede obtener a partir de una placenta de mamífero no perfundida con dicha solución, y no tratada de otra manera para obtener células de la placenta (p. ej., por rotura de tejido, p. ej., digestión enzimática). En este contexto, "significativamente más" significa al menos 10% más. La perfusión proporciona significativamente más células madre de la placenta que, p. ej., el número de células de la placenta que se puede obtener a partir de medio de cultivo en el que se ha cultivado una placenta, o parte de la misma.

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

#### 5.4.5 Aislamiento, clasificación y caracterización de células madre de la placenta

35 Las células de la placenta aisladas, p. ej., las células descritas en la Sección 5.3, anteriormente, ya sean obtenidas mediante perfusión o por rotura física, p. ej., por digestión enzimática, pueden inicialmente ser purificadas a partir de (es decir, ser aisladas de) otras células por centrifugación en gradiente de Ficoll. Semejante centrifugación puede seguir cualquier protocolo convencional para la velocidad de centrifugación, etc. Por ejemplo, las células recogidas de la placenta se recuperan del líquido perfundido por centrifugación a 5000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente, que separa las células, p. ej., de desechos contaminantes y plaquetas. Alternativamente, el líquido perfundido de la placenta se concentra a aproximadamente 200 ml, ligeramente estratificado sobre Ficoll y se centrifuga a aproximadamente 1100 xg durante 20 minutos a 22°C, y la capa de células de la interfaz de baja densidad se recoge para su posterior procesamiento.

40 Los sedimentos celulares se pueden resuspender en la composición de recogida de células madre de nueva aportación, o un medio adecuado para el mantenimiento de células madre, p. ej., medio libre de suero IMDM que contiene 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (Gibco BRL, NY). La fracción total de células mononucleares se puede aislar, p. ej., utilizando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.

45 Las células de la placenta obtenidas mediante perfusión o digestión pueden ser aisladas, por ejemplo, adicionalmente, o inicialmente por tripsinización diferencial utilizando, p. ej., una solución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial es posible porque las células de la placenta aisladas normalmente se separan de las superficies de plástico en aproximadamente 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 con tripsina, utilizando, p. ej., Solución Neutralizadora de Tripsina (TNS, Cambrex). En un ejemplo de aislamiento de células adherentes, se colocan alícuotas, por ejemplo, aproximadamente  $5-10 \times 10^6$  células en cada uno de varios matraces T-75, preferiblemente matraces T75 recubiertos de fibronectina. Preferiblemente, las células pueden ser cultivadas con Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM) (Cambrex) disponible comercialmente, y se colocan en una incubadora de cultivo de tejidos (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiran de los matraces mediante lavado con PBS. La PBS se reemplaza a continuación por MSCGM. Los matraces se examinan preferiblemente todos los días para determinar la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para identificar y ampliar las agrupaciones de células fibroblastoides.

El número y tipo de células recogidas a partir de una placenta de mamífero se pueden monitorizar, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular utilizando técnicas de detección de células convencionales estándar, tales como la citometría de flujo, la clasificación celular, la inmunocitoquímica (p. ej., tinción con anticuerpos específicos del tejido o específicos de marcadores celulares), la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), la clasificación celular magnética activada (MACS), mediante el examen de la morfología de las células utilizando microscopía óptica o confocal, y/o midiendo los cambios en la expresión génica utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, tal como la PCR y el perfilado de la expresión génica. Estos mecanismos se pueden usar, también, para identificar las células que son positivas para uno o más marcadores particulares. Por ejemplo, utilizando anticuerpos para CD34, se puede determinar, utilizando los mecanismos anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; si es así, la célula es CD34<sup>+</sup>. Del mismo modo, si una célula produce suficiente ARN de OCT-4 para que sea detectable por RT-PCR, o significativamente más ARN de OCT-4 que una célula adulta, la célula es OCT-4<sup>+</sup>. Los anticuerpos para marcadores de la superficie celular (p. ej., 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 con Ficoll, adherencia diferencial, o una combinación de ambas, pueden ser clasificadas utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS). La clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para la separación de partículas, incluyendo las células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151: 150-165). La excitación láser de radicales fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de las partículas positivas y negativas de una mezcla. Por ejemplo, los anticuerpos o ligandos específicos de marcadores 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 utilizados. Las partículas clasificadas por FACS se pueden depositar directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En un esquema de clasificación, las células de la placenta, p. ej., las células madre de la placenta y las células pluripotentes de la placenta, se clasifican basándose en la expresión 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 las células madre basándose en sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, se puede lograr un tronco de selección por adherencia antes o después de la clasificación basándose en la expresión del marcador. Por ejemplo, las células se clasifican primero basándose en su expresión de CD34; las células CD34<sup>+</sup> se conservan, y las células que son CD200<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>, se separan del resto de las células CD34<sup>+</sup>. Las células de la placenta se basan en su expresión de los marcadores CD200 y/o HLA-G; por ejemplo, las células que presentan cualquiera de estos marcadores son aisladas para su uso posterior. Las células que expresan, p. ej., CD200 y/o HLA-G pueden ser clasificadas adicionalmente basándose en su expresión de CD73 y/o CD105, o epitopos reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o la falta de expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, las células de la placenta se clasifican por la expresión, o la falta de la misma, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y las células de la placenta que son CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup> se aíslan de otras células de la placenta para su uso posterior.

Con respecto a la detección y clasificación de células de la placenta mediada por anticuerpos, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, se puede utilizar cualquier anticuerpo, específico para un marcador particular, combinado con cualquier fluoróforo u otra marca adecuada para la detección y clasificación de las células (p. ej., clasificación celular activada por fluorescencia). Las combinaciones de anticuerpo/fluoróforo para marcadores específicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra HLA-G (disponibles de Serotec, Raleigh, Carolina del Norte), CD10 (disponibles en BD Immunocytometry Systems, San Jose, California), CD44 (disponibles de BD Biosciences Pharmingen, San José, California), y CD105 (disponibles de R & D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota); anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (PE) contra CD44, CD200, CD117, y CD13 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina-Cy7 (PE Cy7) contra CD33 y CD 10 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados con alofocianina (APC) y estreptavidina contra CD38 (BD Biosciences Pharmingen); y CD90 biotinilado (BD Biosciences Pharmingen). Otros anticuerpos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, CD133-APC (Miltenyi), KDR-Biotina (CD309, Abcam), Citoqueratina K-FITC (Sigma o Dako), HLA ABC-FITC (BD), HLA DR,DQ,DP-PE (BD),  $\beta$ -2-microglobulina-PE (BD), CD80-PE (BD) y CD86-APC (BD).

Otras combinaciones de anticuerpo/marca que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, CD45-PerCP (proteína clorofila peridina); CD44-PE; CD19-PE; CD10-F (fluoresceína); HLA-GF y 7-amino-actinomicina-D (7-AAD); HLA-ABC-F; y similares.

Las células de la placenta aisladas proporcionadas en la presente memoria se pueden analizar para determinar la presencia de CD117 o CD133 utilizando, por ejemplo, anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina-Cy5 (PE Cy5), estreptavidina y biotina contra CD117 o CD133; sin embargo, utilizando este sistema, las células pueden parecer positivas para CD117 o CD133, respectivamente, debido al fondo relativamente alto.

Las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria se pueden marcar con un anticuerpo para un

solo marcador y se detectan y clasifican. Las células de la placenta también se pueden marcar simultáneamente con múltiples anticuerpos contra diferentes marcadores.

Adicionalmente se pueden utilizar esferas magnéticas para separar las células. Las células se pueden clasificar utilizando una técnica de clasificación celular activada magnética (MACS), un método para la separación de partículas en función de su capacidad para unirse a esferas magnéticas (de 0,5 a 100 µm de diámetro). Se puede llevar a cabo una variedad de modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de anticuerpo que reconoce específicamente una molécula de superficie celular o hapteno particular. Las esferas se mezclan a continuación con las células para permitir la unión. Después las células se hacen pasar a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de superficie celular específico. Por ejemplo, estas células se pueden aislar a continuación y volver a mezclar con esferas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de la superficie celular adicionales. Las células se hacen pasar de nuevo a través de un campo magnético, aislando las células que se unen a ambos anticuerpos. Tales células pueden ser diluidas a continuación en placas separadas, 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 las características de morfología y crecimiento celulares. Por ejemplo, las células de la placenta aisladas se pueden caracterizar por tener, y/o se pueden seleccionar en función de, p. ej., una apariencia fibroblastoide en cultivo. Las células de la placenta aisladas también se pueden caracterizar por tener, y/o se pueden seleccionar, en función de su capacidad para formar cuerpos de tipo embriode. Por ejemplo, las células de la placenta aisladas que tienen una forma fibroblastoide, expresan CD73 y CD105, y producen uno o más cuerpos de tipo embriode en cultivo son aisladas de otras células de la placenta. En otro aspecto de la descripción, las células de la placenta OCT-4<sup>+</sup> que producen uno o más cuerpos de tipo embriode en cultivo son aisladas de otras células de la placenta.

Alternativamente, las células de la placenta aisladas pueden ser identificadas y caracterizadas por medio de un análisis de las unidades formadoras de colonias. Los análisis de las unidades formadoras de colonias se conocen comúnmente en la técnica, tales como el medio MESENCULT™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Columbia Británica).

Las células de la placenta aisladas pueden ser evaluadas en cuanto a la viabilidad, el potencial de proliferación, y la longevidad utilizando mecanismos convencionales conocidos en la técnica, tales como el análisis de exclusión de azul de tripán, el análisis de absorción de diacetato de fluoresceína, el análisis de captación de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y el análisis de absorción de timidina, el análisis de proliferación celular MTT (para evaluar la proliferación). La longevidad se puede determinar por métodos bien conocidos en la técnica, tales como la determinación del número máximo de duplicación de la población en un cultivo prolongado.

Las células de la placenta aisladas también se pueden separar de otras células de la placenta utilizando otros mecanismos conocidos en la técnica, p. ej., 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, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación y descongelación; la filtración; la centrifugación convencional y zonal; la decantación centrífuga (centrifugación contracorriente); la unidad de separación por gravedad; la distribución en contracorriente; la electroforesis; y similares.

## 5.5 Cultivo de células de la placenta aisladas

### 5.5.1 Medios de Cultivo

Las células de la placenta aisladas, o poblaciones de células de la placenta aisladas, o células o tejido de la placenta a partir de los cuales se desarrollan células madre de la placenta, se pueden utilizar para iniciar, o sembrar cultivos de células. Las células se transfieren generalmente a recipientes de cultivo de tejidos estériles o bien no recubiertas o bien recubiertas con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (p. ej., nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de la membrana extracelular (p. ej., MATRIGEL® (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

Las células de la placenta aisladas se pueden cultivar en cualquier medio y bajo cualquier condición, reconocida en la técnica como aceptable para el cultivo de células, p. ej., células madre. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende suero. Las células de la placenta aisladas se pueden cultivar, por ejemplo, en DMEM-LG (Medio Esencial Modificado de Dulbecco, 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), dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1, y penicilina/estreptomicina; DMEM-HG (alto contenido de glucosa) que comprende suero bovino fetal (FBS) del 1% al 20%; DMEM-HG comprende FBS al 15%; IMDM (medio de Dulbecco modificado de Iscove) que comprende FBS al 10%, suero de caballo al 10%, e hidrocortisona; M199 que comprende FBS al 10%, EGF, y heparina; α-MEM (medio esencial mínimo) que comprende FBS al 10%, GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende FBS al 10%, GLUTAMAX™ y gentamicina, etc.

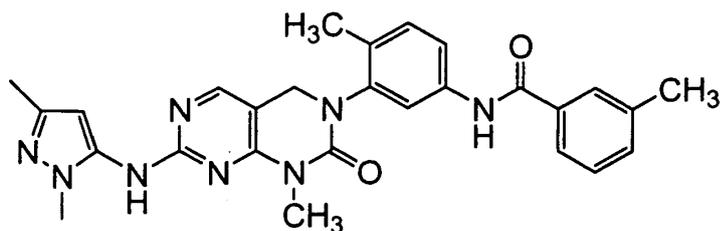
Otros medios que se pueden utilizar para cultivar células de la placenta incluyen DMEM (alto o bajo contenido de glucosa), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB,

DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), y CELL-GRO FREE.

El medio de cultivo se puede complementar con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero (p. ej., suero bovino fetal (FBS), preferiblemente a aproximadamente 2-15% (v/v); suero equino (de caballo) ((ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferiblemente a 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-1 de crecimiento de tipo insulínico (IGF-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más antibióticos y/o agentes antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sean solos o combinados.

Las células de la placenta aisladas se pueden cultivar en condiciones de cultivo de tejidos convencionales, p. ej., en placas de cultivo de tejidos o placas de múltiples pocillos. Las células de la placenta aisladas también pueden ser cultivadas utilizando el método de la gota colgante. En este método, las células de la placenta aisladas se suspenden en aproximadamente  $1 \times 10^4$  células por ml en aproximadamente 5 ml de medio, y se colocan una o más gotas del medio en el interior de la tapa de un recipiente de cultivo de tejidos, p. ej., una placa de Petri de 100 ml. Las gotas pueden ser, p. ej., gotas individuales o múltiples gotas, p. ej., de 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, p. ej., PBS estéril suficiente para mantener el contenido de humedad en la atmósfera de la placa, y se cultivan las células madre.

Además, las células de la placenta aisladas se cultivan en presencia de un compuesto que actúa para mantener un fenotipo indiferenciado en la célula de la placenta aislada. Por ejemplo, el compuesto es una 3,4-sustituido dihidropiridimol[4,5-d]pirimidina. Específicamente, el compuesto es un compuesto que tiene la siguiente estructura química:



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

#### 5.5.2 Expansión y proliferación de las células de la placenta

Una vez que una célula de la placenta aislada, o una población de células de la placenta aisladas (p. ej., una célula de placenta o una población de células de la placenta separada de al menos 50% de las células de la placenta con las cuales la célula madre o la población de células madre se asocia normalmente *in vivo*), la célula o población de células se pueden hacer proliferar y expandir *in vitro*. Por ejemplo, una población de las células de la placenta aisladas se puede cultivar en recipientes de cultivo de tejidos, p. ej., placas, matraces, placas de múltiples pocillos, o similares, durante un tiempo suficiente para que las células proliferen hasta una confluencia de 70-90%, es decir, hasta que las células y su progenie ocupan 70-90% del área de la superficie de cultivo del recipiente de cultivo de tejidos.

Las células de la placenta aisladas se pueden sembrar en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. Por ejemplo, las células se pueden sembrar a baja densidad (p. ej., de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 células/cm<sup>2</sup>) a alta densidad (p. ej., aproximadamente 50.000 o más células/cm<sup>2</sup>). Por ejemplo, las células se cultivan en presencia de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO<sub>2</sub> en el aire. Preferiblemente, las células se cultivan de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O<sub>2</sub> en el aire, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento O<sub>2</sub> en el aire. Las células preferiblemente se cultivan de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente a 37°C. Las células se cultivan preferiblemente en una incubadora. El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, utilizando un biorreactor. Las células de la placenta, p. ej., las células madre de la placenta o las células pluripotentes de la placenta, se cultivan preferiblemente bajo estrés oxidativo bajo (p. ej., con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína, o similares).

Una vez que se obtiene una confluencia de menos de aproximadamente 100%, por ejemplo 70%-90%, las células se pueden trasladar. Por ejemplo, las células se pueden tratar enzimáticamente, p. ej., con tripsina, utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, para separarlas de la superficie del cultivo de tejidos. Después de retirar

las células mediante pipeteo y someter las células a recuento, aproximadamente 10.000-100.000 células/cm<sup>2</sup>, preferiblemente aproximadamente 50.000 células/cm<sup>2</sup>, se hacen pasar a un nuevo recipiente de cultivo que contiene medio de cultivo de nueva aportación. Típicamente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del cual se retiraron las células de la placenta aisladas. Las células de la placenta aisladas se pueden trasladar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, ó 20 veces, o más.

#### Producción de un banco de células de la placenta

Las células aisladas de placentas posparto, p. ej., las células de la placenta aisladas descritas en la Sección 5.3, anterior, se pueden cultivar de numerosas maneras diferentes para producir un conjunto de lotes, p. ej., un conjunto de dosis que se pueden administrar individualmente, de células de la placenta aisladas. Tales lotes se pueden obtener, por ejemplo, a partir de células de líquido perfundido de la placenta o de células de tejido de la placenta digerido con enzima. 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, p. ej., para el almacenamiento a largo plazo. Generalmente, las células de la placenta adherentes al plástico de 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 con un número aproximadamente equivalente de duplicaciones. Los lotes derivan preferiblemente de tejido de una sola placenta, pero pueden derivar de tejido de una pluralidad de placentas.

Los lotes de células de la placenta se pueden obtener como sigue. Primero se rompe el tejido de la placenta, p. ej., mediante picado, se digiere con una enzima adecuada, p. ej., colagenasa (véase la Sección 5.4.3, anterior). El tejido de la placenta comprende preferiblemente, p. ej., la totalidad del amnios, la totalidad del corion, o ambos, de una sola placenta, pero puede comprender sólo una parte de cualquiera del amnios o corion. El tejido digerido se cultiva, p. ej., durante aproximadamente 1 a 3 semanas, preferiblemente aproximadamente 2 semanas. Después de la eliminación de las células no adherentes, se recogen las colonias de alta densidad que se forman, p. ej., por medio de tripsinización. Estas células se recogen y se resuspenden en un volumen conveniente de medio de cultivo, y a continuación se utilizan para sembrar cultivos de expansión. Los cultivos de expansión pueden ser cualquier disposición de aparatos de cultivo de células separados, p. ej., una Fábrica de Células NUNC™. Las células se pueden subdividir en cualquier grado, con el fin de sembrar cultivos de expansión, p. ej., con  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $7 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $9 \times 10^4$ , o  $10 \times 10^4$  células madre. Preferiblemente, se utilizan de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> para sembrar cada cultivo de expansión. El número de cultivos de expansión puede ser mayor o menor en número dependiendo de la placenta o placentas particulares, de las que se obtienen las células.

Los cultivos de expansión se hacen crecer hasta que la densidad de células en cultivo alcanza un cierto valor, p. ej., aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Las células se pueden recolectar y crioconservar en este punto, o trasladar nuevos cultivos de expansión como se ha descrito anteriormente. Las células se pueden trasladar, p. ej., 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. Preferiblemente se mantiene un registro del número acumulado de duplicaciones de la población durante el cultivo o los cultivos de expansión. Las células se pueden expandir 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, antes de dividir la población de células en dosis individuales, es de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30. Las células se pueden cultivar de manera continua durante todo el proceso de expansión, o se pueden congelar en uno o más puntos durante la expansión.

Las células que se van a utilizar para las dosis individuales se pueden congelar, p. ej., crioconservar para su uso posterior. Las dosis individuales pueden comprender, p. ej., 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, se puede elaborar un banco de células de la placenta mediante un método que comprende: la expansión de las células de la placenta del cultivo primario a partir de una placenta humana después del parto para una primera pluralidad de duplicaciones de la población; la crioconservación de dichas células de la placenta para formar un Banco de Células Patrón; la expansión de una pluralidad de células de la placenta a partir del Banco de Células Patrón para una segunda pluralidad de duplicaciones de la población; la crioconservación de dichas células de la placenta para formar un Banco de Células de Trabajo; la expansión de una pluralidad de células de la placenta desde el Banco de Células de Trabajo para una tercera pluralidad de duplicaciones de la población; y la crioconservación de dichas células de la placenta en dosis individuales, en donde dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células de la placenta. Por ejemplo, dichas células de la placenta de cultivo primario comprenden células de la placenta del líquido perfundido de la placenta. Alternativamente, dichas células de la placenta de cultivo primario comprenden células de la placenta de tejido de la placenta digerido. Alternativamente, dichas células de la placenta de cultivo primario comprenden células de la placenta de líquido perfundido de la placenta y de tejido de placenta digerido. Preferiblemente, todas dichas células de la placenta en dicho cultivo primario de células de la placenta son de la misma placenta. El método puede comprender adicionalmente la etapa de seleccionar células de la placenta CD200<sup>+</sup> o HLA-G<sup>+</sup> o células de la placenta CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, de

dicha pluralidad de dichas células de la placenta a partir de dicho Banco de Células de Trabajo para formar dosis individuales. Adicionalmente, dichas dosis individuales pueden comprender de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^5$  células de la placenta, de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^6$  células de la placenta, de aproximadamente  $10^6$  a aproximadamente  $10^7$  células de la placenta, de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^8$  células de la placenta, de aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^9$  células de la placenta, o de aproximadamente  $10^9$  a aproximadamente  $10^{10}$  células de la placenta.

Los métodos de preparación de composiciones que comprenden células de la placenta, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, según lo previsto en la presente memoria, se pueden integrar en la construcción de un banco de células de la placenta en cualquier etapa como se ha descrito anteriormente. La composición farmacéutica se produce después de producir el Banco de Células Patrón, y durante la producción de uno o más Bancos de Células de Trabajo a partir de dicho Banco de Células Patrón, o durante la expansión de las células de la placenta a partir de dichos Bancos de Células de Trabajo. Por ejemplo, las células de la placenta se pueden descongelar a partir de un Banco de Células de Trabajo y cultivar durante una pluralidad de duplicaciones de la población. Cuando se genera un número deseado de células, o ha tenido lugar un número deseado de duplicaciones de la población, se pueden recoger las células de la placenta, p. ej., por centrifugación, y resuspender en una solución que comprende, p. ej., dextrano 40, p. ej., dextrano 40 al 5,5%. Las células madre de la placenta se recogen una segunda vez y se resuspenden en una solución que comprende dextrano y un crioprotector, p. ej., una solución de dextrano 40 al 5,5% que comprende HSA al 10% y DMSO al 5%, y se crioprotectan. Las células de la placenta crioprotectadas se descongelan, p. ej., inmediatamente antes del uso, p. ej., inmediatamente antes de la producción final de la composición como se describe en la Sección 5.2, anterior.

Los métodos anteriores de producción de una composición que comprende células de la placenta, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, se pueden utilizar una vez en la producción y/o el uso de un banco de células de la placenta, p. ej., en cada punto en el cual serían crioprotectadas las células de la placenta, o, p. ej., en el punto en el que se preparan células de la placenta para la administración individual antes de la crioprotección final, y después de la descongelación antes de la administración a un individuo.

Preferiblemente, el donante del que se obtiene la placenta (p. ej., la madre) se somete a ensayo por lo menos para un patógeno. Si la madre da positivo por el patógeno sometido a ensayo, todo el lote de la placenta se descarta. Semejante ensayo se puede realizar en cualquier momento durante la producción de lotes de células de la placenta, incluyendo antes o después del establecimiento del cultivo celular inicial, o durante el cultivo de expansión. Los patógenos cuya presencia se somete a ensayo 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 de la placenta aisladas, p. ej., las células pluripotentes de la placenta aisladas descritas en la Sección 5.2, anterior, se pueden conservar, p. ej., durante la recogida, es decir, se colocan en condiciones que permiten el almacenamiento a largo plazo, o condiciones que inhiben la muerte celular, p. ej., por apoptosis o necrosis, p. ej., durante la recogida o antes de la producción de las composiciones descritas en la presente memoria, p. ej., utilizando los métodos descritos en la presente memoria.

Las células de la placenta se pueden conservar utilizando, p. ej., una composición que comprende un inhibidor de la apoptosis, un inhibidor de la necrosis y/o un perfluorocarbono de transporte de oxígeno, como se describe en la Publicación de la Solicitud de los Estados Unidos relacionada Núm. 2007/0190042. Un método de conservación de una población de células, que se va a utilizar en las composiciones que comprenden células que se presentan en la presente memoria, puede comprender 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 donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células, en comparación con una población de células que no se pone en contacto con el inhibidor de la apoptosis. Por ejemplo, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de caspasa o un inhibidor de JNK. En concreto, 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. Adicionalmente, 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, p. ej., lecitina. Por ejemplo, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$  y aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$ , entre aproximadamente  $2^{\circ}\text{C}$  y  $10^{\circ}\text{C}$ , o entre aproximadamente  $2^{\circ}\text{C}$  y aproximadamente  $5^{\circ}\text{C}$  en el momento de contacto con las células. Dicho contacto se puede producir durante el transporte de dicha población de células. Alternativamente, dicho contacto se puede producir durante la congelación y descongelación de dicha población de células.

Las poblaciones de células de la placenta se pueden conservar, p. ej., mediante un método que comprende poner en contacto dicha población de células con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto de conservación de órganos, en donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir o

prevenir la apoptosis en la población de células, en comparación con una población de células que no se ha puesto en contacto con el inhibidor de la apoptosis. Por ejemplo, el compuesto de conservación de órganos es la solución de UW (descrita en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.798.824; también conocida como ViaSpan; véase también Southard et al., Transplantation 49(2): 251-257 (1990)) o una solución que describen Stem et al., en la Patente de los Estados Unidos No. 5.552.267. Alternativamente, dicho compuesto de conservación de órganos es hidroxietil almidón, ácido lactobiónico, rafinosa, o una combinación de los mismos. Adicionalmente, la composición de recogida de células comprende adicionalmente un perfluorocarbono de transporte de oxígeno, ya sea en dos fases o en forma de una emulsión.

Las células madre de la placenta se pueden poner en contacto con una composición de recogida de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y perfluorocarbono de transporte de oxígeno, compuesto de conservación de órganos, o una combinación de los mismos, durante la perfusión. Alternativamente, dichas células se pueden poner en contacto durante un proceso de rotura del tejido, p. ej., digestión enzimática. Alternativamente, 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 rotura del tejido, p. ej., digestión enzimática.

Típicamente, durante la recogida de células de la placenta, el enriquecimiento y el aislamiento, es preferible reducir al mínimo o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y a la tensión mecánica. Por lo tanto, una célula, o una población de células se pueden exponer a una condición hipóxica durante la recogida, el enriquecimiento o aislamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, en donde una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración normal de oxígeno en la sangre. Preferiblemente, dicha población de células se expone a dicha condición hipóxica a lo largo de menos de dos horas durante dicha conservación. Más preferiblemente, dicha población de células se expone a dicha condición hipóxica durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no se expone a una condición de hipoxia, durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento. Adicionalmente, dicha población de células no se expone a tensión de cizallamiento durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento.

Las células de la placenta se pueden crioconservar, en general o en los métodos específicos descritos en la presente memoria. En una realización, el crioconservante utilizado para crioconservar las células de la placenta es DMSO. En otra realización, el crioconservante es propilenglicol, p. ej., propilenglicol aproximadamente 1,5 M. El crioconservante puede ser también, p. ej., glicerol, etilenglicol, polifenol (p. ej., aproximadamente 30 a aproximadamente 120 ppm) o similares. En otras realizaciones, el crioconservante es suero bovino fetal, suero humano o albúmina de suero humano combinados con uno o más de DMSO, trehalosa y dextrano. En una realización específica, el crioconservante es suero humano, DMSO, y trehalosa, o es suero bovino fetal y DMSO. En ciertas realizaciones, las células de la placenta se crioconservan en un medio de crioconservación en pequeños contenedores, p. ej., ampollas. Las células de la placenta se enfrían preferiblemente aproximadamente 1°C/min durante la crioconservación. Una temperatura de crioconservación preferida es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, preferiblemente de aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C. Las células crioconservadas se pueden transferir a nitrógeno líquido antes de la descongelación para su uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento en nitrógeno líquido. La crioconservación también se puede llevar a cabo utilizando un congelador de velocidad controlada. Las células crioconservadas 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

### 5.7.1 Composiciones que comprenden células de la placenta

Las células de la placenta descritas en la presente memoria, p. ej., en la Sección 5.3, pueden comprender una o más de las células de la placenta, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, descritas en la presente memoria, en donde las células han sido aisladas a partir de una placenta, p. ej., una placenta humana. En otra realización específica, cualquiera de las composiciones anteriores comprende una matriz. En una realización más específica, dicha matriz es un armazón tridimensional. En otra realización más específica, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina, o vitronectina. En otra realización más específica, la matriz es una membrana amniótica o un biomaterial derivado de la membrana amniótica. En otra realización más específica, dicha matriz comprende una proteína de la membrana extracelular. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otra realización más específica, dicho compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, citoquina, anticuerpo, o molécula orgánica de menos de 5.000 dalton.

En otra realización, una composición útil en las composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas, proporcionada en la presente memoria comprende un medio acondicionado por cualquiera de las células de la placenta anteriores, o cualquiera de las poblaciones de células de la placenta anteriores. En una realización específica, cualquiera de dichas composiciones comprende una célula madre que no deriva de una placenta. En una realización más específica, dicha célula madre es una célula madre embrionaria. En otra realización más específica, dicha célula madre es una célula madre mesenquimal. En otra realización más específica, dicha célula madre es una célula madre derivada de médula ósea. En otra realización más específica, dicha célula madre es una célula progenitora

hematopoyética. En otra realización más específica, dicha célula madre es una célula madre somática. En una realización aún 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 5.7.1.1 Composiciones farmacéuticas

Las poblaciones de células de la placenta aisladas, o poblaciones de células que comprenden las células de la placenta aisladas, están contenidas dentro de, o son componentes de, una composición farmacéutica. Las células de la placenta aisladas se pueden preparar en una forma que sea fácilmente administrable a un individuo, p. ej., células de líquido perfundido de la placenta o células de la placenta aisladas que están contenidas dentro de un recipiente adecuado para uso médico. Dicho recipiente puede ser, por ejemplo, una jeringa, una bolsa de plástico estéril, matraz, frasco u otro recipiente del cual se pueda dispensar fácilmente la población de células madre de la placenta. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico, médicamente aceptable adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un destinatario. El recipiente en ciertas realizaciones es uno que permite la criopreservación de la población de células de la placenta aisladas.

En una realización, el recipiente es un recipiente que facilita o permite, el rendimiento de una o más de las etapas del método descritas en la presente memoria. Por ejemplo, cuando el método de producción de una composición que comprende células comprende, p. ej., las etapas de (a) poner en contacto dichas células con una solución que comprende dextrano y albúmina de suero humana (HSA) para producir una solución que contiene células; (b) filtrar la solución a través de un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , (c) diluir dichas células a aproximadamente 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro con una primera solución de dilución que comprende dextrano; y (d) diluir dichas células con una segunda solución de dilución que comprende dextrano pero no comprende HSA, las células, p. ej., las células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, se pueden colocar en un recipiente, p. ej., entre las etapas (c) y (d), en donde el recipiente es un recipiente que, p. ej., facilita la criopreservación y/o facilita el suministro de las células a un individuo que necesite células, o similares. En ciertas realizaciones, dicho diluyente está a no más de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicho diluyente está a no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En otras ciertas realizaciones, si el número de células es menor de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, la filtración es opcional.

Por ejemplo, las células de la placenta aisladas se pueden criopreservar, p. ej., en una bolsa, p. ej., una bolsa de sangre o similar, y descongelar y diluir finalmente en la misma bolsa. En otra realización, en donde el método de producción de una composición que comprende células comprende, p. ej., (a) la centrifugación de una pluralidad de células, p. ej., células de líquido perfundido de la placenta o células de la placenta aisladas para recoger las células; (b) la resuspensión de las células en dextrano 40 al 5,5%; (c) la centrifugación de las células para recoger las células; (d) la resuspensión de las células en una solución de dextrano 40 al 5,5% que comprende HSA al 10%; (e) la filtración de las células a través de un filtro de 70  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ; (f) la dilución de las células en dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10%, y DMSO al 5% a no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células/ml; (g) la criopreservación de las células; (h) la descongelación de las células; e (i) la dilución de las células de 1:1 a 1:11 con dextrano 40 al 10% para producir dicha composición farmacéutica, la colocación de las células en un recipiente que, p. ej., facilita la criopreservación y/o la administración de las células a un individuo que lo necesita se puede llevar a cabo, p. ej., en cualquier etapa después de la etapa (e). En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) es de aproximadamente 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) es de no más de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células por mililitro. En otras ciertas realizaciones, si el número de células es menor de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, la filtración es opcional. En una realización específica, por ejemplo, las células, p. ej., células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, se pueden colocar en el recipiente después de la filtración, a continuación, en el recipiente, diluir, criopreservar, descongelar, y/o finalmente diluir antes de la administración al individuo.

Las células de la placenta aisladas en las composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas, proporcionadas en la presente memoria, pueden comprender células de la placenta derivadas de un solo donante o de múltiples donantes. Las células de la placenta aisladas pueden ser completamente compatibles con HLA para un destinatario pretendido, o parcialmente o completamente incompatibles con HLA.

Las células de la placenta aisladas en las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden administrar a un individuo que lo necesite. Por ejemplo, dichas células de la placenta aisladas se administran por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, subcutánea, intravenosa o intraocular. Adicionalmente, las células de la placenta aisladas en las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden administrar a un individuo que lo necesite en forma de una composición que comprende células de la placenta aisladas en un recipiente. Por ejemplo, el recipiente es una bolsa, matraz, o frasco. Preferiblemente, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. Por ejemplo, dicha bolsa es adecuada para, permite o facilita la administración intravenosa de dichas células de la placenta aisladas, p. ej., por infusión intravenosa, inyección en embolada, o similar. 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 soluciones distintas, p. ej., un fármaco, antes de, o durante, la administración. En otra realización específica, antes de la criopreservación, la solución que comprende las células de la placenta aisladas comprende uno o más compuestos que facilitan la criopreservación de las células combinadas. En otra

realización específica, dichas células de la placenta aisladas están contenidas dentro de una solución acuosa fisiológicamente aceptable. Por ejemplo, dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable es una solución de NaCl al 0,9%. Adicionalmente, dichas células de la placenta aisladas pueden comprender células de la placenta que son compatibles con HLA para un destinatario de dicha población celular. Alternativamente, dichas células combinadas comprenden células de la placenta que son al menos parcialmente incompatibles con HLA para un destinatario de dicha población celular. Dichas células de la placenta pueden derivar de una pluralidad de donantes.

Las células de la placenta aisladas en la composición farmacéutica pueden ser cualquiera de las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria. En una realización específica, las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria son células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, que están contenidas dentro de un recipiente. En una realización específica, las células de la placenta aisladas descritas en la presente memoria son células CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> que están contenidos dentro de un recipiente. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> que están contenidas dentro de un recipiente. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> que están contenidas dentro de un recipiente. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> que están contenidas dentro de un recipiente, en donde dichas células facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan con una población de células de la placenta en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> que han sido crioconservadas, y están contenidas dentro de un recipiente. En otra realización específica, las células de la placenta aisladas son células OCT-4<sup>+</sup> que están contenidas dentro de un recipiente, en donde dichas células facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan con una población de células de la placenta en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En una realización específica de cualquiera de las células de la placenta anteriores, dicho recipiente es una bolsa.

Dicho recipiente puede comprender aproximadamente, al menos, o a lo sumo 1 x 10<sup>6</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, 5 x 10<sup>6</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, 1 x 10<sup>7</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, 5 x 10<sup>7</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, 1 x 10<sup>8</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, 5 x 10<sup>8</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, 1 x 10<sup>9</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, 5 x 10<sup>9</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, o 1 x 10<sup>10</sup> células de la placenta células aisladas o células de líquido perfundido de la placenta. Una dosis unitaria única de células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta puede comprender, en diversas realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de 1 x 10<sup>5</sup>, 5 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>6</sup>, 5 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>7</sup>, 5 x 10<sup>7</sup>, 1 x 10<sup>8</sup>, 5 x 10<sup>8</sup>, 1 x 10<sup>9</sup>, 5 x 10<sup>9</sup>, 1 x 10<sup>10</sup>, 5 x 10<sup>10</sup>, 1 x 10<sup>11</sup> o más células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta. Alternativamente, un recipiente o dosis de células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta comprenden de 1 x 10<sup>5</sup> a 5 x 10<sup>5</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 5 x 10<sup>5</sup> a 1 x 10<sup>6</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 1 x 10<sup>6</sup> a 5 x 10<sup>6</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 5 x 10<sup>6</sup> a 1 x 10<sup>7</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 1 x 10<sup>7</sup> a 5 x 10<sup>7</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 5 x 10<sup>7</sup> a 1 x 10<sup>8</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 1 x 10<sup>8</sup> a 5 x 10<sup>8</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 5 x 10<sup>8</sup> a 1 x 10<sup>9</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 1 x 10<sup>9</sup> a 5 x células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 5 x 10<sup>9</sup> a 1 x 10<sup>10</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 1 x 10<sup>10</sup> a 5 x 10<sup>10</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, de 5 x 10<sup>10</sup> a 1 x 10<sup>11</sup> células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta, o más células de la placenta aisladas o de líquido perfundido de la placenta. Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende un número suficiente de células de la placenta aisladas o células de líquido perfundido de la placenta para administrar de aproximadamente 2 x 10<sup>7</sup> a aproximadamente 10 x 10<sup>7</sup> células por kilogramo de un destinatario.

En otras realizaciones específicas de cualquiera de las poblaciones crioconservadas anteriores, dichas células han sido trasladadas, 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 crioconservadas anteriores, dichas células se han ampliado dentro de dicho recipiente.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las células madre de la placenta descritas en la presente memoria pueden comprender cualquiera, o cualquier combinación, de las poblaciones de células de la placenta, aisladas o tipos de células de la placenta aisladas, descritas en otra parte en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células de la placenta fetales, maternas, o tanto fetales como maternas, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender adicionalmente células de la placenta aisladas obtenidas a partir de un solo individuo o placenta, o de una pluralidad de individuos o placentas.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria comprenden poblaciones de células que comprenden 50% de células viables o más (es decir, al menos 50% de las células de la población son funcionales o están vivas). Preferiblemente, al menos 60% de las células de la población son viables. Más preferiblemente, al

menos 70%, 80%, 90%, 95%, ó 99% de las células de la población en la composición farmacéutica son viables.

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

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender uno o más compuestos que, p. ej., facilitan el injerto (p. ej., anticuerpos anti-receptor de células T, un inmunosupresor, o similares); estabilizantes tales como albúmina, dextrano 40, gelatina, hidroxietilalmidón, Plasmanyte, y similares.

### 30 5.7.2 Composiciones que comprenden células de la placenta hematopoyéticas o células de líquido perfundido de la placenta

En ciertas realizaciones de las composiciones proporcionadas en la presente memoria, las células de la placenta aisladas son células madre de la placenta CD34<sup>+</sup>, p. ej., células de la placenta hematopoyéticas o células progenitoras. Tales células se pueden obtener a partir de tejido de la placenta, p. ej., a partir de una placenta cuya sangre del cordón umbilical se ha drenado y perfundido para eliminar la sangre residual. En ciertas realizaciones, las células madre de la placenta CD34 son CD38<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas CD34<sup>+</sup> son CD38<sup>-</sup>. En otras ciertas realizaciones, las células de la placenta aisladas CD34<sup>+</sup> son CD45<sup>+</sup>. En una realización específica, las células de la placenta aisladas son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, las células son células hematopoyéticas. En una realización más específica, las células de la placenta CD34<sup>+</sup> son células hematopoyéticas. En ciertas realizaciones, las células CD34<sup>+</sup> o las células hematopoyéticas se obtienen a partir de líquido perfundido de la placenta. En ciertas realizaciones, las células CD34<sup>+</sup> o células hematopoyéticas se obtienen mediante digestión enzimática o rotura física del tejido de la placenta. Las células CD34<sup>+</sup> y las células hematopoyéticas se pueden obtener de una sola placenta, o de más de una placenta.

En ciertas realizaciones, las células de las composiciones proporcionadas en la presente memoria, formuladas por los métodos proporcionados en la presente memoria, son células obtenidas de líquido perfundido de la placenta. Según se utiliza en la presente memoria, "células obtenidas de líquido perfundido de la placenta" incluye células nucleadas totales obtenidas a partir de, p. ej., aisladas de, líquido perfundido de la placenta, un subconjunto de células nucleadas obtenidas de líquido perfundido de la placenta, o células cultivadas o que se hacen proliferar a partir de células obtenidas directamente de líquido perfundido de la placenta. El líquido perfundido de la placenta se puede obtener a partir de una placenta cuya sangre del cordón umbilical ha sido drenada y perfundida para eliminar la sangre residual, antes de la perfusión para obtener células de la placenta. El líquido perfundido de la placenta se puede obtener a partir de una placenta cuya sangre del cordón umbilical ha sido drenada, pero no perfundida para eliminar la sangre residual. El líquido perfundido de la placenta se puede obtener a partir de una placenta cuya sangre del cordón no ha sido drenada ni perfundida para eliminar la sangre residual. En las dos últimas realizaciones, las células de la placenta, p. ej., las células nucleadas de líquido perfundido de la placenta, por ejemplo, las células nucleadas totales de líquido perfundido de la placenta, comprenden células nucleadas de sangre de la placenta y/o sangre de cordón. Las células de líquido perfundido de la placenta se pueden obtener de una sola placenta, o de más de una placenta.

### 5.7.3 Líneas celulares inmortalizadas de la placenta

60 Las células de la placenta de mamífero pueden ser inmortalizadas condicionalmente por transfección con cualquier

vector adecuado que contenga un gen promotor del crecimiento, es decir, un gen que codifica una proteína que, en condiciones apropiadas, promueve el crecimiento de la célula transfectada, de manera que la producción y/o actividad de la proteína que promueve el crecimiento es 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 del poliovirus, E1a de adenovirus o proteína E7 de 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, p. ej., un promotor cuya actividad puede ser controlada, por ejemplo, mediante la modificación de la temperatura de las células transfectadas o la composición del medio en contacto con las células. Por ejemplo, se puede emplear un sistema de expresión de genes controlado por tetraciclina (tet) (véase Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551, 1992; Hoshimaru et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1518-1523, 1996). En ausencia de tet, un transactivador controlado por tet (tTA) dentro de este vector activa fuertemente la transcripción de  $ph_{CMV^{-1}}$ , un promotor mínimo de citomegalovirus humano fusionado a secuencias del operador tet. tTA es una proteína de fusión del represor (tetR) del operón de resistencia a tet derivado del transposón 10 de *Escherichia coli* y el dominio ácido de VP16 del virus del herpes simplex. Las bajas concentraciones no tóxicas de tet p. ej., 0,01-1,0  $\mu\text{g/ml}$  casi anulan completamente la transactivación por tTA.

Por ejemplo, el vector contiene adicionalmente un gen que codifica un marcador seleccionable, p. ej., una proteína que confiere resistencia a fármacos. El gen bacteriano de resistencia a neomicina ( $neo^R$ ) es uno de tales marcadores que puede ser empleado dentro de los presentes métodos. Las células que llevan  $neo^R$  pueden ser seleccionadas por medios conocidos por los expertos normales en la técnica, tales como la adición de, p. ej., 100-200  $\mu\text{g/ml}$  de G418 al medio de crecimiento.

La transfección se puede conseguir por cualquiera de una variedad de medios conocidos por los expertos normales en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, la infección retroviral. En general, un cultivo de células se puede transfectar por medio de incubación con una mezcla de medio acondicionado 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, p. ej., cinco días *in vitro* por medio de incubación durante aproximadamente 20 horas en un volumen de medio acondicionado y dos volúmenes de DMEM/F12 que contiene suplementos de N2. Las células transfectadas que llevan un marcador de selección pueden ser seleccionadas a continuación como se ha descrito anteriormente.

Después de la transfección, los cultivos se trasladan sobre una superficie que permite la proliferación, p. ej., permite que al menos 30% de las células se dupliquen en un período de 24 horas. Preferiblemente, el sustrato es un sustrato de poliornitina/laminina, que consiste en plástico de cultivo tisular recubierto con poliornitina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y/o laminina (10  $\mu\text{g/ml}$ ), un sustrato de polilisina/laminina o una superficie tratada con fibronectina. Los cultivos se alimentan a continuación cada 3-4 días con medio de crecimiento, que puede o no ser complementado con uno o más factores de mejora de la proliferación. Factores de mejora de la proliferación se pueden añadir al medio de crecimiento cuando los cultivos presentan una confluencia de menos de 50%.

Las líneas celulares de la placenta inmortalizadas condicionalmente se pueden trasladar utilizando técnicas convencionales, tales como tripsinización, cuando hay una confluencia de 80-95%. Hasta aproximadamente el vigésimo traslado, resulta beneficioso mantener la selección (mediante, por ejemplo, la adición de G418 para las células que contienen un gen de resistencia a neomicina). Las células también se pueden congelar en nitrógeno líquido para 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 ha descrito anteriormente. En general, tales líneas celulares clonales se pueden aislar utilizando técnicas convencionales, tales como dilución limitante o utilizando anillos de clonación y se pueden expandir. Las líneas celulares clonales pueden generalmente ser alimentadas y trasladadas como se ha descrito anteriormente.

Se puede inducir la diferenciación de las líneas celulares de la placenta humana inmortalizadas condicionalmente, que pueden, pero no necesitan, ser clonales, mediante la supresión de la producción y/o actividad de la proteína promotora del crecimiento en condiciones de cultivo que facilitan la diferenciación. Por ejemplo, si el gen que codifica la proteína promotora del crecimiento está bajo el control de un promotor externamente regulable, las condiciones, p. ej., la temperatura o la composición del medio, se pueden modificar para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. Para el sistema de expresión del gen controlado por tetraciclina comentado anteriormente, la diferenciación se puede conseguir mediante la adición de tetraciclina para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. En general, 1  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina durante 4-5 días es suficiente para iniciar la diferenciación. Para promover aún más la diferenciación, se pueden incluir agentes adicionales en el medio de crecimiento.

#### 5.7.4 Kits

En otro aspecto, se describen adicionalmente en la presente memoria kits para la producción y/o la administración de las composiciones que contienen células de la placenta aisladas de la presente invención.

Se describe en la presente memoria un kit que comprende, en recipientes separados, una o más de una solución

que comprende dextrano, p. ej., dextrano 40, una solución que comprende albúmina de suero humano (HSA), y un crioprotector. Por ejemplo, el kit comprende una pluralidad de células de la placenta aisladas, p. ej., células de la placenta aisladas crioprotectadas. Alternativamente, el kit comprende un recipiente que comprende una solución que comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v) y HSA al 10% (p/v). Alternativamente, el kit comprende un recipiente que comprende una solución que comprende dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10% y DMSO al 5% o, el kit comprende un recipiente que comprende una solución de dextrano 40 al 10%.

Además, el kit comprende un filtro, o una pluralidad de filtros, adecuados para la filtración de suspensiones de células. Preferiblemente, uno o más de los filtros del kit comprenden poros entre aproximadamente 50  $\mu\text{M}$  de diámetro a aproximadamente 150  $\mu\text{M}$  de diámetro. Preferiblemente, el filtro es un filtro de 70  $\mu\text{M}$  o el filtro es un filtro de 100  $\mu\text{M}$ .

Adicionalmente, el kit comprende uno o más artículos de material de vidrio o recipientes de plástico adecuados para la producción o el uso de una de las composiciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, el kit puede comprender, p. ej., una bolsa de plástico adecuada para la crioprotección o la dilución o el suministro de una suspensión de células, p. ej., una suspensión de células de la placenta aisladas. Alternativamente, el kit comprende (1) una pluralidad de células de la placenta aisladas, p. ej., células madre de la placenta o células pluripotentes de la placenta, p. ej., en uno o más viales; (2) material de plástico suficiente para el cultivo de dichas células de la placenta aisladas para, p. ej., 2-3 traslados; (3) un recipiente que comprende una solución que comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v) y HSA al 10% (p/v); (4) un recipiente que comprende una solución que comprende dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10% y DMSO al 5%; (5) un recipiente que comprende una solución de dextrano 40 al 10%; y (6) uno o más filtros que comprenden poros de entre aproximadamente 50  $\mu\text{M}$  de diámetro a aproximadamente 150  $\mu\text{M}$  de diámetro, en donde los filtros son adecuados para soluciones de filtrado que comprenden células.

## 6. Ejemplos

6.1 Ejemplo 1: Método mejorado para producir composiciones administrables que comprenden células de la placenta aisladas

Este Ejemplo demuestra la formulación de células de la placenta aisladas CD34<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> humanas tanto antes como después de la crioprotección, para producir células de la placenta aisladas, de alta viabilidad, homogéneas para la administración a seres humanos o animales. La composición resultante comprende células de la placenta aisladas que presentan una alta viabilidad y sin macro-cúmulos de células durante de al menos un período de 4 horas después de la descongelación. Un estudio de dosificación aguda en ratón demostró que los ratones NOD/SCID toleraban una dosis máxima de al menos 1,5 millones de células por ratón (aproximadamente 75 millones de células por kg suponiendo un peso medio de 20 gramos) utilizando la formulación final descrita a continuación mediante la administración por infusión intravenosa sin ningún toxicidad cardíaca o pulmonar (evidenciada por respiración dificultosa, movimiento en círculos, y ataxia), y hasta 250 millones de células por kg por vía subcutánea, una mejora con respecto a las formulaciones anteriores. Mientras que el siguiente ejemplo describe la formulación de las células de la placenta aisladas que expresan marcadores de superficie particulares, los resultados presentados en la presente memoria indican que los métodos y las formulaciones se pueden utilizar, y son compatibles, con otras células, p. ej., células de mamífero que expresan diferentes marcadores de superficie.

### *Análisis de cúmulos de células*

Los cúmulos de células (agregaciones) fueron clasificados como macro-cúmulos de células o micro-cúmulos de células. Se identificaron los macro-cúmulos de células y los micro-cúmulos de células, si estaban presentes, de acuerdo con los siguientes procedimientos.

### *Análisis de macro-cúmulos de células*

Las células se descongelaron en un recipiente en un baño de agua a 37°C hasta que sólo quedó un pequeño trozo de hielo en el recipiente. Las células se extrajeron del recipiente utilizando una jeringa equipada con una aguja de calibre 16, y las células fueron dispensadas desde el recipiente a un tubo cónico de 50 ml. La presencia o ausencia de macro-cúmulos de células se evaluó mediante inspección visual.

### *Análisis de micro-cúmulos de células*

Las células se contaron para determinar la concentración de células. Las células se diluyeron a continuación hasta  $4 \times 10^6$  células/ml con dextrano 40 al 10%, y se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de las células, 40  $\mu\text{l}$  de dextrano 40 al 10%, y 10  $\mu\text{l}$  de una solución de esferas de medición de 40  $\mu\text{M}$  a un tubo de microcentrifuga de 1,7 ml. El contenido del tubo se mezcló suavemente. Se colocaron diez  $\mu\text{l}$  de la muestra mezclada en un portaobjetos de vidrio y se cubrieron con un cubreobjetos. Se contaron todos los micro-cúmulos de células que comprendían tres o más células.

Las células de la placenta utilizadas fueron obtenidas inicialmente a partir de un banco de células que contenía las poblaciones de células de la placenta adherentes, como se describe en la presente memoria, que se han sometido a 4-6 traslados antes de la crioprotección.

5 Los datos de comparación de los tampones compatibles con la inyección in vivo, utilizando dos líneas celulares de placenta aisladas diferentes, indicaron que la solución salina tamponada con fosfato (PBS), Plasmalyte A y el Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con un suplemento de albúmina de suero humano (HSA) al 1% son todos capaces de mantener una alta viabilidad de las células después de 5 horas tras la descongelación. La concentración final de células en el tampón fue de  $25 \times 10^6$  células/ml. Se seleccionó Plasmalyte A por promover la más alta viabilidad de las células para los tampones sometidos a ensayo. Como se demuestra en la Tabla 10a y la Tabla 10b la alta viabilidad se mantuvo durante varias horas después de la descongelación; además, los fenotipos nominales no cambiaron a lo largo de más de 3 horas después de la descongelación. La viabilidad de las células en la formulación después de la descongelación no se vio afectada de manera significativa tras el traslado de las células a través de una aguja de calibre 26. No fue posible una determinación de la formación de cúmulos de células en estos dos experimentos debido al pequeño volumen de la muestra utilizada.

10 Basándose en los datos de la Tabla 1a y la Tabla 1b, la formulación después de la descongelación se finalizó como sigue: Las células se descongelaron a 37°C en un baño de agua, e inmediatamente se diluyeron 1:1 (v/v) con tampón de descongelación (HSA al 2,5% + Dextrano 40 al 5%). Las células se centrifugaron a continuación a 400 g durante 5 minutos, y se resuspendieron en Plasmalyte A + HSA al 1%.

Tabla 1a: Viabilidad después de la descongelación y fenotipo de las células de la placenta en Plasmalyte A + HSA al 1% sin un ensayo con jeringa/aguja.

	0 horas	1 hora	3 horas	5 horas
Viabilidad	98,0%	97,1%	92,4%	93,8%
CD105+/200+	84,3%		87,9%	

20 Tabla 1b: Viabilidad después de la descongelación y fenotipo de las células de la placenta en Plasmalyte A + HSA al 1% con un ensayo jeringa/aguja.

	0 horas	1 hora	3 horas	5 horas
Viabilidad	98,0%	97,2%	93,7%	97,3%
CD105+/200+	87,3%		87,3%	

*Estudio de biodistribución en ratón*

25 La formulación después de la descongelación anterior se aplicó en un estudio piloto de biodistribución en ratón. No se observaron macro-cúmulos de células durante la preparación de células después de la descongelación, sobre todo después de la adición de Plasmalyte. Con esta preparación de células, se observó toxicidad pulmonar aguda a una dosis de 1 millón de células por ratón (aproximadamente 20 g) por medio de dos infusiones intravenosas repetidas de 0,5 millones de células cada una. Estas dos observaciones llevaron a una mayor investigación de la formulación de células de la placenta.

30 Basándose en las observaciones de un estudio piloto de biodistribución en ratón de que se inducían cúmulos de células significativos después de la adición de Plasmalyte A, pero no de Dextrano 40, se utilizó Dextrano 40 para este estudio como un medio de dilución, junto con Plasmalyte A, HSA y PBS.

Tabla 2: Clasificación de cúmulos de células a las 4 horas de la descongelación. Los números más bajos indican un menor número de cúmulos.

Medio	Dextrano 40 al 5% + HSA al 10%	Dextrano 40 al 5% + HSA al 2,5%	Dextrano 40 al 5%	PBS	Plasmalyte A
Rango de cúmulos de células	1	1	2	3	3

35 Las células, previamente congeladas en Plasmalyte A + HSA al 10% + DMSO al 5%, se descongelaron en un baño de agua a 37°C, y se diluyeron 1:7 con los respectivos tampones. Los datos de la Tabla 2 muestran que el Dextrano 40 con HSA inducían menos cúmulos de células entre los medios sometidos a ensayo.

5 Se observaron agregados de células inmediatamente después de la descongelación en diversas formulaciones. La adición de una etapa de filtración, en donde las células se filtraron después de la descongelación a través de un filtro de 100 µm, eliminó los agregados de células. Se sometieron a ensayo dos lotes de células de la placenta para determinar el efecto de la filtración combinado con diluyentes específicos. No se formaron macro-cúmulos de células después de la filtración cuando las células se diluyeron 1:1 con Dextrano 40 al 10% a lo largo de un período de tiempo de 4 horas post-descongelación. Véanse las Tablas 3a-3c. Además, la viabilidad se mantuvo alta. Se observaron resultados similares a través de varios lotes diferentes de células de la placenta.

Tabla 3a: Macro-cúmulo de células

Macro-cúmulo de células existente en la bolsa después de la descongelación	LOTE 1		LOTE 2	
	Sí, grandes láminas		Sí, pequeños puntos	
Macro-cúmulo de células recién formado después de la filtración	Plasmalyte A	Dextrano 40 al 5%	Plasmalyte A	Dextrano 40 al 5%
		Sí	No	Sí, pero mucho menos que en el LOTE 1

10 Tabla 3b: Micro-cúmulos de células después de la filtración en Dextrano 40

	LOTE 1	LOTE 2
3-5 cúmulos de células (cúmulos/10 <sup>6</sup> células)	1210	416
5 cúmulos de células (cúmulos/10 <sup>6</sup> células)	491	119

Tabla 3c: Viabilidad después de la filtración en Dextrano 40 y Plasmalyte A

	LOTE 1		LOTE 2	
	Dextrano 40	Plasmalyte A	Dextrano 40	Plasmalyte A
0 h	91,5%	92,4%	94,2%	94,5%
2 horas	92,5%		93,9%	
4 horas	91,8%	94,7%	94,7%	93,3%

15 Basándose en los estudios anteriores, la formulación de células de la placenta después de la descongelación se simplificó con el siguiente procedimiento: Las células se descongelaron en un baño de agua a 37°C durante hasta 3 minutos, después se filtraron a través de un colador de 100 µm. Las células coladas se diluyeron 1:1 (v:v) con dextrano 40 al 10%.

*Formulación antes de la congelación*

20 También se observaron cúmulos de células en la fase de pre-congelación del procesamiento de las células. Se estudiaron el medio de congelación, la densidad celular de congelación y una etapa de filtración en suspensión para reducir y/o eliminar los agregados de células antes de la congelación.

*Medio de congelación*

25 Basándose en el éxito del Dextrano 40 en la formulación después de la descongelación, anterior, se comparó el Dextrano 40 con Plasmalyte como medio de congelación. Las células del LOTE 3 se congelaron a una concentración de 17 millones de células por ml en Plasmalyte A + HSA al 10% + DMSO al 5% o en Dextrano 40 al 5% + HSA al 10% + DMSO al 5%. La presencia de cúmulos de células se evaluó como sigue:

Tabla 4a: Comparación de Plasmalyte y Dextrano 40 como medio de congelación - Macro-cúmulos de células

	Plasmalyte A	Dextrano 40
Macro-cúmulo de células	Más que con Dextrano 40	Menos que con Plasmalyte A
Pérdida de células después de la filtración con colador de 100 µm	20%	3%

Tabla 4b: Comparación de Plasmalyte A y Dextrano 40 como medio de congelación - Micro-cúmulos de células

	Plasmalyte A	Dextrano 40
3-5 cúmulos de células (cúmulos/10 <sup>6</sup> células)	1893	523
> 5 cúmulos de células (cúmulos/10 <sup>6</sup> células)	929	205

5 Tabla 4c: Comparación de Plasmalyte A y Dextrano 40 como medio de congelación - Viabilidad

	Plasmalyte	Dextrano 40
0 horas después de la descongelación	89,9%	90,8%
4 horas después de la descongelación	89,2%	91,3%

El uso de dextrano 40 en estos experimentos dio como resultado menos macro-cúmulos de células, menos micro-cúmulos de células, y una mayor viabilidad celular que el uso de Plasmalyte A. Basándose en estos resultados, el Dextrano 40 fue seleccionado como medio de congelación.

10 *Densidad de células de congelación y Filtración pre-congelación*

Con el fin de eliminar los macro-cúmulos de células y minimizar los micro-cúmulos de células, se examinaron la densidad de células y la filtración antes de la congelación como sigue:

Tabla 5a: Efecto de la densidad de células de congelación y la filtración antes de la congelación sobre la formación de cúmulos de células.

	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4
Filtración	Sí, colador 70 µm	No	Sí, colador 70 µm	No
Concentración	20 × 10 <sup>6</sup>	20 × 10 <sup>6</sup>	5 × 10 <sup>6</sup>	5 × 10 <sup>6</sup>
Medio de congelación	Dextrano 40 al 5% + HSA al 10% + DMSO al 5%	Dextrano 40 al 5% + HSA al 10% + DMSO al 5%	Dextrano 40 al 5% + HSA al 10% + DMSO al 5%	Dextrano 40 al 5% + HSA al 10% + DMSO al 5%

Concentración: células por mililitro.

Tabla 5b: Efecto de la densidad de células de congelación y la filtración antes de la congelación sobre la formación de macro-cúmulos de células.

	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4
Filtración antes de la congelación	No	sí	No	sí
Filtración después de la descongelación	No	sí	No	sí

No: No hay formación de macro-cúmulos.  
Sí: Formación de macro-cúmulos.

5

Tabla 5c: Efecto de la densidad de células de congelación y la filtración antes de la congelación sobre los micro-cúmulos de células (cúmulos por cada  $10^6$  células)

	Condición 1		Condición 2		Condición 3		Condición 4	
	3-5 micro-cúmulos de células	micro-cúmulos de >5 células	micro-cúmulos de 3-5 células	micro-cúmulos de >5 células	micro-cúmulos de 3-5 células	micro-cúmulos de >5 células	micro-cúmulos de 3-5 células	micro-cúmulos de >5 células
Antes de la congelación	188	0	291	194	231	46	237	172
Después de la descongelación	688	375	631	655	231	116	323	366

10

Los resultados mostrados en las Tablas 5B y 5C muestran claramente que la filtración antes de la congelación elimina la formación de macro-cúmulos de células después de la descongelación. Los datos también indican que las muestras con alta concentración de células, por ejemplo,  $20 \times 10^6$  células/ml, tienen más potencial para formar micro-cúmulos de células después de la descongelación. Como resultado, se examinó el efecto de la densidad de células de la congelación sobre la formación de cúmulos de células.

Tabla 6a: Efecto de la densidad de células de congelación sobre la formación de cúmulos de células

LOTE 4	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4
Concentración	$15 \times 10^6$	$10 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$
Filtración	colador de 70 $\mu$ m			
Medio de congelación	Dextrano 40 al 5% + HSA al 10% + DMSO al 5%	Dextrano 40 al 5% + HSA al 10% + DMSO al 5%	Dextrano 40 al 5% + HSA al 10% + DMSO al 5%	Dextrano 40 al 5% + HSA al 10% + DMSO al 5%

Concentración: número de células por mililitro.

Tabla 6b: Efecto de la densidad de células de congelación sobre la formación de macro-cúmulos de células

	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4
Antes de la congelación	Sí (1 cúmulo)	No	No	No
Después de la descongelación 0 h	Sí (3 cúmulos)	Sí (1 cúmulo)	No	No
Después de la descongelación 4 h	Sí (3 cúmulos)s	Sí (1 cúmulo)	No	No

No: No hay formación de macro-cúmulos de células.  
Sí: Hay formación de macro-cúmulos de células

Tabla 6c: Efecto de la densidad de células de congelación sobre los micro-cúmulos de células

	(cúmulos por cada 10 <sup>6</sup> células)							
	Condición 1		Condición 2		Condición 3		Condición 4	
	3-5 células	> 5 células	3-5 células	> 5 células	3-5 células	> 5 células	3-5 células	> 5 células
Antes de la congelación	141	70	130	65	83	33	103	34
Después de la descongelación 0 h	271	193	111	44	102	34	108	46
Después de la descongelación 4 h	298	212	105	53	122	44	97	55

5

Los resultados de las Tablas 6b y 6c muestran que la densidad de congelación a  $7,5 \times 10^6$ /ml o menos no induce macro-cúmulos de células después de la descongelación. Por otra parte, a concentraciones de hasta  $10 \times 10^6$  células/ml, el número de micro-cúmulos de células es razonablemente bajo, menos de 200 micro-cúmulos de células/millón de células.

- 10 Basándose en los resultados anteriores, las formulaciones de antes de la congelación y después de la descongelación se generaron como sigue. Para la formulación de antes de la congelación, se centrifugaron células de la placenta de cultivo líquido a 220 xg durante 5 minutos, y se resuspendieron en Dextrano 40 al 5% a aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células/ml. Las células se centrifugaron a 400 xg durante 10 minutos, después se resuspendieron en Dextrano 40 al 6% y HSA al 10% a aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células/ml. Las células resuspendidas se hicieron pasar a continuación a través de un filtro de 70  $\mu$ M por gravedad. A continuación, se diluyeron las células filtradas en Dextrano 40 al 5%, HSA al 10%, y DMSO al 5% a una concentración de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por ml. Las células diluidas se colocaron en crio-bolsas, se congelaron y se almacenaron en nitrógeno en fase de vapor. Para la formulación después de la descongelación, las células congeladas se descongelaron en un baño de agua a 37°C, después se diluyeron con dextrano 40 al 10% a diferentes proporciones en volumen de 1:1 a 1:5 de tampón que contiene células:dextrano 40.

#### *Evaluación de la Formulación de células de la placenta*

##### *1. Ausencia de formación de macro-cúmulos de células después de la descongelación*

- 25 Se produjeron cinco lotes de células de la placenta utilizando el método de formulación anterior (incluyendo el LOTE 11 y el LOTE 12, descritos a continuación). No se observaron macro-cúmulos de células después de la descongelación en ninguno de los cinco lotes, y el número de micro-cúmulos de células permaneció bajo.

##### *2. Ausencia de impacto sobre el fenotipo*

El fenotipo de las células de la placenta no se vio afectado por la formulación mejorada. Más de 90% de las células en la formulación siguió siendo CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>.

##### *3. Estudios en ratón GLP*

Se utilizaron células del LOTE 12 para un estudio de biodistribución en ratón. Las células de la placenta se administraron en la formulación anterior en forma de una sola y/o repetidas inyecciones intravenosas en la vena de la cola de ratones NOD-SCID macho y hembra o ratones macho C57BL/10SgSnAi-Rag2(tmi)yc(tmi). Los ratones se sacrificaron a los 4, 14, 28 ó 47 días del tratamiento y se procesaron y analizaron muestras de pulmón, hígado, corazón, riñones, bazo, glándulas suprarrenales, médula ósea, y cerebro por medio de Q-PCR para determinar la presencia de la secuencia de ADN de hTERT; hTERT es el gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana. Después de la administración i.v., se detectó el ADN humano en el ADN total aislado de las muestras de pulmón, cerebro, corazón y/o hígado de los ratones que fueron sacrificados a los 4 días de la administración de dosificación. Se detectaron los niveles más altos de ADN en el pulmón. Los ratones fueron capaces de tolerar la administración de 25-100 millones de células por kg mediante infusión intravenosa sin ninguna toxicidad cardíaca o pulmonar. Se utilizaron células del LOTE 11 para un estudio de la tumorigenicidad en ratón. Se administraron a los ratones hasta 250 millones de células por kg por vía subcutánea (SC), sin efectos adversos.

6.2 Ejemplo 2: Composiciones mejoradas que se pueden administrar

Este Ejemplo demuestra una formulación de células de la placenta CD34<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> adherente al plástico del cultivo de tejidos pluripotentes humanas, que incluso después de la crioconservación, representan células de alta viabilidad, homogéneas, adecuadas para la administración a seres humanos o animales. Las células de la formulación muestran, de media, una disminución de 400 veces en la cantidad de agregados formados, y una mejora de la Dosis Máxima Tolerada (MTD) de aproximadamente 3 veces que una formulación anterior en un modelo de ratón por vía intravenosa (datos no mostrados). Mientras que el siguiente ejemplo describe la formulación de las células de la placenta aisladas que expresan marcadores de superficie particulares, los resultados presentados en la presente memoria indican que los métodos y las formulaciones se pueden utilizar, y son compatibles, con otras células, p. ej., células de mamífero que expresan diferentes marcadores de la superficie.

La formulación (designada "Formulación B") comprende células de la placenta del fenotipo celular anterior a una concentración de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células/ml, en una solución que contiene Dextrano 40 al 5,5% (p/v), albúmina de suero humano (HSA) al 10% (p/v) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% (v/v). La HSA y el Dextrano 40 utilizados en la presente memoria son de grado clínico; el DMSO es de calidad GMP.

En la Tabla 7, se describe una formulación basada en Plasmalyte designada "Formulación A", y se compara con la Formulación B, una formulación a base de Dextrano 40. Las células se filtran en suspensión a través de una malla de 70 µm en la preparación de la Formulación B, pero no se filtran en la preparación de la Formulación A.

Tabla 7: Composición de la Formulación A y la Formulación B

	Formulación A	Formulación B
Concentración celular	$27 \pm 8 \times 10^6$ células/ml	$10 \pm 3 \times 10^6$ células/ml
Excipiente a granel	Plasmalyte	Dextrano 40 al 5,5% en solución salina
Concentración de DMSO	5% (v/v)	5% (v/v)
Concentración de HSA	10%	10%

Se observó una agregación celular significativa cuando se descongeló la Formulación A. La investigación posterior demostró que numerosos parámetros, incluyendo la composición del medio de formulación y la concentración de células de congelación eran los principales contribuyentes a la agregación de las células. Se realizaron estudios de optimización y la Formulación B fue diseñada específicamente para reducir o eliminar estos efectos de la agregación celular. Además, se introdujo la filtración de la suspensión celular a través de una malla de 70 µm como parte del proceso para proporcionar un mejor control de las suspensiones de células durante la formulación.

Para cuantificar los agregados de células en las formulaciones, se ideó un análisis de retención en el filtro como una herramienta de desarrollo y se utilizó para comparar una serie de lotes de composición de células de la placenta producidos por la Formulación A y la Formulación B. Esto se volvió particularmente crítico, ya que la agregación de las células en la Formulación B se redujo hasta el punto de que ya no era discernible a simple vista de una manera fiable. Una comparación de múltiples muestras analizadas de series representativas de la Formulación A y la Formulación B se muestra en la Tabla 8. El método cuantifica los agregados de células teñidas previamente retenidas en un filtro de diferentes muestras mediante la formación de imágenes digitales del filtro, e informa de la zona de filtro ("Zona Media") cubierta por los agregados. Como se muestra en la Tabla 8, la Formulación B tenía cada vez menos cobertura de la zona (agregados) que la Formulación A, siendo la diferencia media de 400 veces. Los datos también muestran un buen control y reproducibilidad del proceso para la Formulación B. Los lotes de composición de células de la placenta aisladas de las dos formulaciones utilizadas para los estudios in vivo también se indican en la Tabla 16. El cambio de la Formulación A a la Formulación B mejoró la Dosis Máxima Tolerada

(MTD) aproximadamente 3 veces en un modelo *in vivo* intravenosa de ratón (datos no mostrados).

Tabla 8: Formación de agregados después de la descongelación en la Formulación A y la Formulación B

Lote	Bolsas	Filtros	Zona media (px/MM)	Des. Típ.	CV	Formulación (ensayo <i>in vivo</i> se indica con *)
1	2	13	97490	38369	0,39	Formulación A
2	1	12	98629	33165	0,34	Formulación A *
1	1	2	63	81	1,28	Formulación B *
2	1	2	38	12	0,32	Formulación B
3	1	2	1539	573	0,37	Formulación B *
4	1	2	137	43	0,31	Formulación B
5	3	6	125	162	1,29	Formulación B
6	3	6	71	57	0,81	Formulación B

5 Clave: "Bolsas" indica el número de bolsas de composición de células aisladas descongeladas y sometidas a ensayo para ese Lote; "Filtros" indica el número total de réplicas del análisis para ese Lote; "Zona Media" indica la cobertura de la zona media de los filtros para ese Lote en unidades de píxeles/millón de células aplicadas al filtro; "Desv. Típ." = desviación típica; "CV" = Coeficiente de Variación.

### 6.3 Ejemplo 3: Caracterización de las composiciones mejoradas que se pueden administrar

10 Este ejemplo proporciona una caracterización adicional de las formulaciones farmacéuticas que comprenden HSA, dextrano 40, y DMSO. Los métodos utilizados en uno o más de los experimentos descritos a continuación son los siguientes:

Evaluación de la viabilidad celular: La viabilidad se analizó por medio de un análisis de exclusión de azul de tripán utilizando un hemocitómetro o un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California). La viabilidad se expresó como el porcentaje de células viables de entre las células totales.

15 Recuentos de células: Las células se contaron utilizando un hemocitómetro o un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California). Los recuentos de células se expresaron como millones de células por mililitro (MM/ml).

20 Agregación celular: Se midió la cantidad de agregación celular utilizando un Análisis de Retención en Filtro (FRA), que mide la cantidad de agregación celular mediante la tinción de las células y haciéndolas pasar a través de un filtro de 70 µm. Los agregados celulares superiores a 70 µm no pueden pasar por el filtro y se cuantifican mediante el análisis de imágenes utilizando un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California). Los datos se expresan en píxeles por millón de células cargadas (px/MM).

25 Citometría de flujo: Las células fueron evaluadas para determinar los niveles de los marcadores celulares CD10, CD34, CD 105 y CD200 mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como el porcentaje de células positivas y/o negativas para un marcador particular, o combinación de marcadores.

Inmunosupresión: La actividad inmunosupresora de las células en las formulaciones descritas a continuación se evaluó mediante un análisis de Reacción de las células T con Esferas (BTR), que mide la capacidad de las células para suprimir una respuesta de células T a esferas antigénicas.

30 Si bien el siguiente ejemplo describe la formulación de las células de la placenta aisladas que expresan marcadores de la superficie particulares, los resultados presentados en la presente memoria indican que se pueden utilizar los métodos y las formulaciones, y son compatibles con otras células, p. ej., células de mamífero que expresan diferentes marcadores de la superficie.

#### 6.3.1 Caracterización de las razones de DMSO y Dextrano:HSA

35 Este ejemplo describe el efecto de variar las concentraciones de HSA, Dextrano, y DMSO, y de variar la razón de dextrano con respecto a HSA, sobre la agregación celular, la viabilidad y la recuperación celulares, y el fenotipo y la funcionalidad de las células.

*Condiciones experimentales*

Se investigó el espacio de solución de los tres componentes (HSA, dextrano 40 y DMSO) para la formulación de células en las condiciones mostradas en el diagrama ternario de la FIG. 1. Las condiciones experimentales se eligieron a lo largo de dos ejes: uno que sometía a ensayo diferentes porcentajes de DMSO mientras mantenía la razón de dextrano:HSA constante (véanse las formulaciones 1-4, a continuación), y otro que variaba la razón de dextrano:HSA mientras mantenía el porcentaje de DMSO constante (véanse las formulaciones 3, 5-8, a continuación).

*Métodos y Materiales*

Se expandieron aproximadamente doce millones de células pluripotentes de la placenta CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> criopreservadas en Fábricas Celulares de 10 bandejas de Nunc™, una para cada una de las formulaciones siguientes, a aproximadamente  $1,2 \times 10^6$  células. Se recogieron las células por incubación durante 10 min a temperatura ambiente con tripsina/EDTA al 0,25%. Las células disociadas se transfirieron a un tubo de centrifuga de 500 ml que contenía 250 ml de suero bovino fetal (FBS) al 2% en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM). Las células se centrifugaron a continuación a 1040 RPM en tubos de 500 ml en una centrífuga Sorvall RC3BP. Las células se resuspendieron en solución salina al 0,9%/solución de dextrano 40 al 5%. Las células se centrifugaron a continuación a 1420 RPM durante 10 min, y se suspendieron en 10 ml de una de las ocho formulaciones siguientes (las razones de dextrano:HSA se muestran en unidades de "fracción en volumen de HSA al 25%" (VF HSA) para las formulaciones y 5-8):

*Formulación 1:* DMSO al 20%, HSA al 8,5%, dextrano 40 al 4,6%

*Formulación 2:* DMSO al 10%, HSA al 9,5%, dextrano 40 al 5,2%

*Formulación 3:* DMSO al 5%, HSA al 10%, dextrano 40 al 5,5% (VF HSA = 0,4) (formulación de control)

*Formulación 4:* DMSO al 0%, HSA al 10,5%, dextrano 40 al 5,8%

*Formulación 5:* DMSO al 5%, HSA al 0%, dextrano 40 al 9,5% (VF HSA = 0)

*Formulación 6:* DMSO al 5%, HSA al 3,125%, dextrano 40 al 8,25% (VF HSA = 0,125)

*Formulación 7:* DMSO al 5%, HSA al 16,88%, dextrano 40 al 2,75% (VF HSA = 0,675)

*Formulación 8:* DMSO al 5%, HSA al 23,75%, dextrano 40 al 0% (VF HSA = 0,95)

Las formulaciones se prepararon a partir de las siguientes soluciones de partida: DMSO al 100% (Bioniche Pharma, Belleville, Ontario), HSA al 25% (Octapharma, Hoboken, Nueva Jersey) y dextrano 40 al 10% en solución salina al 0,9% (Hospira, Lake Forest, Illinois).

*Análisis de retención en filtro:* se evaluó la agregación celular mediante el uso del análisis de retención en filtro. La concentración celular se ajustó a aproximadamente  $1,2 \times 10^7$  células/ml antes de la filtración. La carga del filtro (número de células por unidad de área de filtro) se mantuvo constante a aproximadamente  $2,4 \times 10^8$  células/filtro. Las células fueron criopreservadas en un congelador de velocidad controlada Thermo a -70°C a una concentración de  $7,5 \times 10^6$  células/ml. Las células se descongelaron antes de su uso, y las muestras se procesaron en breve después de la descongelación. Se tomó una muestra de 100 µl de la suspensión de células sin diluir tras la descongelación, se diluyó con 900 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS), y los recuentos de células se realizaron por duplicado utilizando un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California) y se refirieron como el número de píxeles por millón de células (los números más altos de píxeles indican un mayor número de agregados celulares).

*Análisis de viabilidad celular (análisis MTS):* La viabilidad celular se determinó utilizando un Análisis de Proliferación Celular No Radiactivo CellTiter96® (Promega, Madison, Wisconsin). Las células en placas de 96 pocillos se combinaron con (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) (MTS) y metosulfato de fenazina (PMS), un reactivo de acoplamiento de electrones, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación se determinó la absorbancia a 490 nm del producto de formazano resultante, producido por biorreducción celular de MTS.

*Análisis en placa de pocillos con Anexina:* Las células descongeladas se diluyeron a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml en una solución de Marcaje de Anexina-V (Roche, Núm. Cat. 11 828 681 001.). Se añadieron 100 µl de la suspensión celular a una placa de 96 pocillos por triplicado y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente sin exposición a la luz. Después de 15 minutos, se tomaron imágenes de campo claro y bajo luz fluorescente (longitud de onda de excitación 488 nm y longitud de onda de detección 528 nm) de tres posiciones diferentes dentro de cada pocillo. Se utilizó un soporte lógico de recuento de células automatizado (Axiovision) para contar las células totales por imagen. Las poblaciones de células apoptóticas/necróticas se determinaron mediante recuento de células positivas para Anexina en cada posición (imagen fluorescente) y dividiendo por el total de células en cada posición (imagen de campo claro). Las poblaciones de células apoptóticas/necróticas por condición

se determinaron promediando las poblaciones computadas en tres posiciones de los pocillos diferentes, de 3 pocillos.

### Resultados

#### Agregación celular

5 A través de los porcentajes variables de DMSO, p. ej., de 0 a 20 por ciento (formulaciones 1-4), no se observó efecto sobre la agregación celular, tal como se muestra en la FIG. 2. Todas las condiciones de DMSO mostraron niveles de agregación dentro del intervalo observado para la formulación de control que comprende DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5% y HSA al 10%. Las concentraciones de HSA y Dextrano también se variaron a una concentración constante de DMSO al 5% (FIG. 3), con condiciones que variaban entre ausencia de HSA (fracción en volumen de HSA = 0) y ausencia de dextrano (fracción en volumen de HSA = 0,95). Los valores de FRA a través de las fracciones en volumen de 0,125 a 0,95 de HSA al 25% (concentración final de HSA de 3,125% a 23,75%, respectivamente) indican una agregación mínima. Los niveles observados de agregación en presencia de HSA eran iguales o inferiores a los de la formulación de control que comprende DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5% y HSA al 10%.

#### Viabilidad tras la descongelación y recuperación

15 Se midieron la viabilidad después de la descongelación (FIG. 4) y la recuperación después de la descongelación (FIG. 5) a través de diferentes porcentajes de DMSO (0, 5, 10 y 20%) por medio de exclusión de azul de tripán, utilizando el contador de células automatizado Vi-Cell, para evaluar las capacidades crioprotectoras de cada formulación. La viabilidad después de la descongelación fue mayor de 90% con las formulaciones que comprendían DMSO al 0%, 5% y 10%, respectivamente, observándose un valor máximo con DMSO al 5%, mientras que la viabilidad estaba por debajo de 75% con una formulación que comprendía DMSO al 20%. El restablecimiento del cultivo se midió mediante el análisis MTS. Se observó que el restablecimiento del cultivo era máximo con DMSO al 5% (FIG. 6).

25 El perfil de viabilidad a través de las diferentes fracciones en volumen de HSA al 25%, es decir, diferentes razones de dextrano:HSA, se muestra en las FIGS. 7-9. La viabilidad después de la descongelación, determinada por exclusión de azul de tripán, mostró valores que oscilaban entre 83,5% y 98,5% a través de las diferentes fracciones en volumen de HSA (FIG. 7). Se alcanzó un valor máximo a una fracción de 0,40 de HSA al 25%, es decir, HSA al 10%:Dextrano 40 al 5,5%. La recuperación de células después de la descongelación también se calculó, y los valores variaban de 80% a 120%, aunque las muestras que comprendían al menos una fracción en volumen de 0,2 de HSA al 25% mostraban valores que oscilaban de 100% a 120% (FIG. 8). Los datos de restablecimiento del cultivo, tal como se determina mediante el análisis MTS, exhiben un perfil similar al de la viabilidad después de la descongelación, apareciendo un valor máximo en una fracción de 0,125 de BSA al 25%, es decir, HSA al 3,13%:Dextrano 40 al 8,25% (FIG. 9).

35 La viabilidad con tripán no tiene la capacidad de detectar las células apoptóticas. Sin embargo el análisis de las distribuciones de tamaño de las células puede indicar cambios en la salud de las células. Para estimar el porcentaje de células apoptóticas en las poblaciones de células descongeladas a partir de células congeladas en ausencia de DMSO, se llevó a cabo un análisis de anexina en placas con pocillos tras la descongelación. El análisis estima que 51% de las células congeladas en DMSO al 0% eran apoptóticas en comparación con 15% de apoptóticas cuando se congelaron en DMSO al 5% (datos no mostrados).

#### Fenotipo y funcionalidad

40 La capacidad de mantener el fenotipo CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> de las células se sometió a ensayo a través de los diferentes porcentajes de los componentes por medio de citometría de flujo. Las células formuladas en la formulación 2 (DMSO al 10%, HSA al 9,5%, dextrano 40 al 5,2%), la formulación 5 (DMSO al 5%, HSA al 0%, dextrano 40 al 9,5%), la formulación 6 (DMSO al 5%, HSA al 3,13%, dextrano 40 al 8,25%) y la formulación 7 (DMSO al 5%, HSA al 16,88%, dextrano 40 al 2,75%) mantuvieron este fenotipo aproximadamente, así como la formulación 3 de control, y tuvieron valores de CD105<sup>+</sup>/CD200<sup>+</sup> entre 80,3% y 84,5%. Además, la expresión de CD10<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> fue > 95% para cada formulación. Las condiciones 1, 4 y 8 indican un cambio en las características físicas de las células, posiblemente debido a que los restos afectaron al análisis de citometría de flujo.

50 La funcionalidad celular se evaluó a través del análisis de Reacción de células T con Esferas (BTR), que mide la capacidad de las células para suprimir una respuesta de las células T a esferas antigénicas (FIG. 10). La formulación 6 (DMSO al 5%, HSA al 3,13%, dextrano 40 al 8,25%), y la formulación 7 (DMSO al 5%, HSA al 16,88%, dextrano 40 al 2,75%) presentaron una supresión dentro de una desviación típica de 1 de una formulación de control 3 que comprendía DMSO al 5%/HSA al 10% y dextrano 40 al 5,5%. Estas tres muestras presentaron las mayores viabilidades con azul de tripán y los valores de restablecimiento del cultivo. Las otras muestras tuvieron niveles más bajos de supresión, con una reducción que generalmente se correlacionaba con una disminución de MTS.

55 Conclusiones:

Las formulaciones que comprenden concentraciones de DMSO del 0 al 20% muestran niveles de agregación celular

comparables a los observados para la formulación de control que comprende DMSO al 5%, HSA al 10% y dextrano 40 al 5,5%. Sin embargo, la viabilidad celular se redujo cuando las células se crioconservaron en la formulación que comprende DMSO al 20%, y las células congeladas en DMSO al 0% mostraron una apoptosis significativamente mejorada después de la descongelación en relación con las células congeladas en DMSO al 5%. No hubo una degradación apreciable del fenotipo CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> para formulaciones que comprendían DMSO al 5% y al 10%. Por lo tanto, los resultados anteriores demuestran que se prefiere el uso de formulaciones que comprenden DMSO al 5-10% para mantener la viabilidad después de la descongelación.

Con respecto a la variación de la razón de HSA: dextrano, las formulaciones que comprenden HSA al 23,75%, dextrano al 0% mostraron cierta reducción en la viabilidad después de la descongelación y el restablecimiento del cultivo, mientras que los valores viabilidad, actividad inmunosupresora y el restablecimiento después de la descongelación fueron más altos para formulaciones que comprendían razones de dextrano:HSA de: (i) HSA al 3,13% con respecto a dextrano al 8,25%; (ii) HSA al 10% con respecto a dextrano al 5,5%; y (iii) HSA al 16,88% con respecto a dextrano al 2,75%. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la razón de HSA:dextrano de las formulaciones descritas en la presente memoria puede variar dentro de un intervalo definido sin una pérdida apreciable de viabilidad celular, recuperación de células después de la descongelación, degradación del fenotipo CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> o actividad inmunosupresora, con relación a las formulaciones que comprenden una razón de HSA:dextrano de HSA al 10% y dextrano 40 al 5,5%. Los datos presentados en la presente memoria apoyan un intervalo de trabajo de razones de HSA:dextrano entre al menos aproximadamente 6:1 de HSA:dextrano y aproximadamente 1:2,6 de HSA:dextrano.

### 6.3.2 Efecto de la densidad de células de congelación

Este ejemplo describe los efectos de la concentración de células, p. ej., densidades celulares de congelación que oscilan entre 1-40 x 10<sup>6</sup> células/ml, sobre la viabilidad celular; el fenotipo CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>; la agregación celular; y la funcionalidad inmunosupresora de las células.

#### Métodos y Materiales

Se cultivaron células madre de la placenta CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> durante 3 días, se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en una formulación que comprendía DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10% a una concentración de aproximadamente 3,5 x 10<sup>7</sup> células/ml, y se filtraron a través de un filtro de 70 µm. Después de la filtración las células se diluyeron en serie en la formulación anterior para crear muestras de células que comprendieran, en bolsas estériles, las siguientes densidades de células: 1 x 10<sup>6</sup> células/ml, 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 15 x 10<sup>6</sup> células/ml y 20 x 10<sup>6</sup> células/ml. Las células se recogieron por separado para crear una muestra de células separada que comprendiera 4,0 x 10<sup>7</sup> células/ml. Las células de la muestra de 4,0 x 10<sup>7</sup> células/ml se resuspendieron en 5 ml de formulación que comprendía DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10% a una concentración de aproximadamente 4,6 x 10<sup>7</sup> células/ml, se filtraron a través de un filtro de 70 µm, y se diluyeron a 4,0 x 10<sup>7</sup> células/ml en una bolsa de 20 ml utilizando la formulación anterior. Se congelaron una bolsa de 20 ml de la muestra de 4,0 x 10<sup>7</sup> células/ml, bolsas de 20 ml duplicadas de las muestras de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml, 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 15 x 10<sup>6</sup> células/ml, y 20 x 10<sup>6</sup> células/ml, y cinco viales de 280 µl de cada muestra a -70°C utilizando un congelador de velocidad controlada. Estas muestras se descongelaron posteriormente y se analizaron para determinar los efectos de la concentración de congelación sobre varias características celulares, incluyendo (1) el recuento de células; (2) la viabilidad; (3) el fenotipo; (4) la agregación de células; y (5) la potencia.

*Análisis de retención en filtro:* Se evaluó la agregación celular mediante el uso del análisis de retención en filtro. La concentración celular se ajustó a aproximadamente 1,2 x 10<sup>7</sup> células/ml antes de la filtración. La carga del filtro (número de células por unidad de área de filtro) se mantuvo constante a aproximadamente 2,4 x 10<sup>8</sup> células/filtro. Las células fueron crioconservadas en un congelador de velocidad controlada Thermo a -70°C a una concentración de 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml. Las células se descongelaron antes de su uso, y las muestras se procesaron en breve después de la descongelación. Se tomó una muestra de 100 µl de la suspensión de células sin diluir tras la descongelación, se diluyó con 900 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS), y los recuentos de células se realizaron por duplicado utilizando un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California) y se refirieron como número de píxeles por millón de células (los números más altos de píxeles indican un mayor número de agregados celulares).

#### Resultados:

##### Recuento/viabilidad de células

Se tomaron dos muestras de 1 ml de cada una de las bolsas descongeladas para los recuentos de células viables y la determinación de la viabilidad utilizando un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La viabilidad promedio permaneció constante para todas las condiciones, a aproximadamente 97%. El recuento de células viables correspondió a la concentración inicial de congelación (véase la Tabla 9 a continuación).

Tabla 9: Concentración de células viables Vi-Cell y viabilidad

Concentración de congelación	Recuento de células (x 10 <sup>6</sup> ) células/ml	Viabilidad (%)
1 x 10 <sup>6</sup> /ml	1,20	98,70
7,5 x 10 <sup>6</sup> /ml	8,32	97,12
15 x 10 <sup>6</sup> /ml	16,47	97,33
20 x 10 <sup>6</sup> /ml	20,80	97,61
40 x 10 <sup>6</sup> /ml	39,92	96,71

Fenotipo

5 Se sometió a ensayo la capacidad de mantener el fenotipo CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> de las células a través de las diferentes densidades de células por citometría de flujo. Tal como se presenta en la Tabla 10, el fenotipo no cambia entre las diferentes concentraciones de congelación. La expresión de CD200<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> se mantuvo a aproximadamente 86% y la expresión de CD34<sup>-</sup>/CD10<sup>+</sup> se mantuvo a aproximadamente 99% para todas las condiciones.

10

Tabla 10: Expresión de CD200<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup>/CD10<sup>+</sup>

Concentración de congelación	CD200 <sup>+</sup> /CD105 <sup>+</sup>	CD34 <sup>-</sup> /CD10 <sup>+</sup>
1 x 10 <sup>6</sup> /ml	87,3	98,2
7,5 x 10 <sup>6</sup> /ml	86,7	99,1
15 x 10 <sup>6</sup> /ml	85,8	99,1
20 x 10 <sup>6</sup> /ml	85,5	98,9
40 x 10 <sup>6</sup> /ml	86,3	98,5
Control negativo	69,4	98,5
Control positivo	91,1	98,8

Agregación celular

15 Se analizaron réplicas de cada condición mediante un análisis de retención en filtro para determinar el grado de agregación celular a diferentes concentraciones de congelación (FIG. 11). Los duplicados del análisis se realizaron para las muestras de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml, 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 15 x 10<sup>6</sup> células/ml y 20 x 10<sup>6</sup> células/ml. Una muestra de células se analizó por duplicado para la muestra de 40 x 10<sup>6</sup> células/ml. La muestra de 40 x 10<sup>6</sup> células/ml produjo la señal de agregación celular más alta de todas las densidades celulares sometidas a ensayo. Todas las otras muestras estaban en o por debajo de la cantidad de agregación observada con una muestra de control previamente crioconservada a 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml en DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10%.

20 Se realizó un análisis de agregación celular separado adicional, para someter a ensayo las células crioconservadas en la formulación que comprende DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10% en 7,5 x 10<sup>6</sup>/ml y 20 x 10<sup>6</sup>/ml (FIG. 12). Los datos adicionales mostraron un aumento de la señal a 20 x 10<sup>6</sup>/ml, indicando que las células congeladas a 20 x 10<sup>6</sup>/ml proporcionan resultados de agregación celular variables. Como resultado, las células congeladas a esta concentración o superior tienen un mayor potencial de agregación. Estos datos demuestran que la agregación aumenta al aumentar la concentración de células, y una densidad de células de congelación de 20 x 10<sup>6</sup> ml puede mostrar aumentos en la agregación celular con respecto a una densidad celular de congelación de 7,5 x 10<sup>6</sup>/ml.

25

Funcionalidad

Se utilizó un vial de cada condición para la reacción de leucocitos mixtos (MLR) y el análisis de la reacción de las células T con esferas (BTR) para evaluar las propiedades inmunomoduladoras de las células a diferentes

5 densidades de células de congelación, según se mide por la supresión de la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup>. Los resultados de MLR indican una caída en la supresión de CD4 y CD8 a 15 x 10<sup>6</sup> células/ml y 40 x 10<sup>6</sup> células/ml, a pesar de que la supresión a 20 x 10<sup>6</sup> células/ml fue comparable a la observada a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml y 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml. Sin embargo, los resultados de BTR muestran una reducción en la supresión de CD4 y CD8 a 20 x 10<sup>6</sup> células/ml y 40 x 10<sup>6</sup> células/ml.

Tabla 11: Resultados de MLR y BTR - porcentaje de reactividad de las células T en comparación con la reactividad de las células T en ausencia de células madre de la placenta.

Muestra	MLR		BTR	
	Supresión de CD4	Supresión de CD8	Supresión de CD4	Supresión de CD8
1 x 10 <sup>6</sup> /ml	63	64	63	62
7,5 x 10 <sup>6</sup> /ml	63	64	63	62
15 x 10 <sup>6</sup> /ml	49	46	61	64
20 x 10 <sup>6</sup> /ml	65	65	36	39
40 x 10 <sup>6</sup> /ml	40	45	33	38

Conclusiones:

10 Los resultados anteriores demuestran que la viabilidad celular y el fenotipo CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> no cambian como función de la densidad celular de congelación. Sin embargo, las células crioconservadas a una densidad de 20 x 10<sup>6</sup> células/ml demostraron un aumento variable en la agregación celular y una disminución variable en la actividad inmunosupresora, mientras que las células crioconservadas a una densidad de 40 x 10<sup>6</sup> células/ml mostraron un aumento constante de la agregación celular y una disminución constante de la actividad inmunosupresora. Como tal, mientras que las células se pueden formular en las formulaciones descritas en la presente memoria a una densidad de hasta, p. ej., 40 x 10<sup>6</sup> células/ml sin una disminución apreciable en la viabilidad celular o en el número de células que muestran un fenotipo CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, una densidad celular de congelación en el intervalo de 1,0-15 x 10<sup>6</sup> células/ml es preferible para reducir al mínimo la agregación celular después de la descongelación.

20 6.3.3 Efecto del peso molecular del dextrano

Este ejemplo describe el efecto de diferentes pesos moleculares de dextrano, por ejemplo, dextrano 1 (PM = 1000), dextrano 40 (PM = 40.000) y dextrano 70 (PM = 70.000) sobre la agregación celular, la viabilidad, la recuperación, el fenotipo CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y la funcionalidad.

Materiales y métodos

25 Se expandieron doce millones de células pluripotentes de la placenta CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> crioconservadas en fábricas de células de 10 bandejas de Nunc™, una para cada una de las formulaciones siguientes, a aproximadamente 1,2 x 10<sup>8</sup> células. Las células se recogieron por incubación durante 10 min. a temperatura ambiente con Tripsina/EDTA al 0,25%. Las células disociadas se transfirieron a un tubo de centrifuga de 500 ml que contenía 250 ml de suero bovino fetal al 2% (FBS) en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM). Las células se centrifugaron a 1040 RPM en tubos de 500 ml en una centrífuga Sorvall RC3BP. Las células se resuspendieron en una solución salina al 0,9%/dextrano 40 al 5%. Las células se centrifugaron después a 1420 rpm durante 10 min, y se suspendieron en 10 ml de las siguientes formulaciones:

Formulación 1: DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5% (Hospira, Lake Forest, Illinois), HSA al 10% (control)

Formulación 2: DMSO al 5%, dextrano 1 al 5,5% 1 (Pharmacosmos), HSA al 10%

35 Formulación 3: DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5% (Pharmacosmos), HSA al 10%

Formulación 4: DMSO al 5%, dextrano 70 al 5,5% (Pharmacosmos), HSA al 10%

40 *Análisis de retención en filtro:* Se evaluó la agregación celular mediante el uso del análisis de retención en filtro. La concentración celular se ajustó a aproximadamente 1,2 x 10<sup>7</sup> células/ml antes de la filtración. La carga del filtro (número de células por unidad de área de filtro) se mantuvo constante a aproximadamente 2,4 x 10<sup>8</sup> células/filtro. Las células fueron crioconservadas a una concentración de 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml en un congelador de velocidad

controlada Thermo a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las células se descongelaron antes de su uso, y las muestras se procesaron en breve después de la descongelación. Se tomó una muestra de 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células sin diluir tras la descongelación, se diluyó con 900  $\mu\text{l}$  de solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se llevaron a cabo los recuentos de células por duplicado utilizando un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California).

#### Resultados:

##### Agregación celular

Se evaluó la agregación celular dentro de cada formulación mediante el Análisis de retención en filtro. La formulación 2 (dextrano 1), la formulación 3 (dextrano 40) y la formulación 4 (dextrano 70) demostraron tasas de agregación de células equivalentes a, o por debajo de, la formulación de control de DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, y HSA al 10% (FIG. 13).

##### Viabilidad y recuperación

La viabilidad después de la descongelación para las muestras que comprendían dextrano 1, dextrano 40 o dextrano 70 varió de 96,0% a 97,7% de viables (FIG. 14). Del mismo modo, la recuperación después de la descongelación fue comparable a la de la formulación de control, con viabilidades de células que oscilaban entre 92% y 109% de la formulación de control (FIG. 15).

##### Fenotipo y funcionalidad

Se sometió a ensayo la capacidad de mantener el fenotipo  $\text{CD}10^{+}$ ,  $\text{CD}34^{-}$ ,  $\text{CD}105^{+}$ ,  $\text{CD}200^{+}$  de las células a través de los diferentes pesos moleculares de dextrano por citometría de flujo, y se sometió a ensayo la capacidad inmunosupresora de las células en un análisis BTR. La expresión de  $\text{CD}200^{+}/\text{CD}105^{+}$  a través de todas las formulaciones sometidas a ensayo osciló de 89,1% a 91,6%, y la expresión de  $\text{CD}34/\text{CD}10^{+}$  fue  $> 95\%$  para todas las condiciones (FIG. 16). Además, la supresión de las células T  $\text{CD}4^{+}$  y  $\text{CD}8^{+}$  a través de los diferentes pesos moleculares de dextrano cayó dentro de una desviación típica de 1 de un valor esperado derivado de 4 diferentes réplicas experimentales de una formulación de control convencional que comprendía dextrano 40 (FIG. 17).

#### Conclusiones:

Estos resultados demuestran que el dextrano 1 o el dextrano 70 pueden ser sustituidos por dextrano 40 en las formulaciones descritas en la presente memoria, sin afectar a la agregación celular, la viabilidad, la recuperación, el fenotipo o la capacidad inmunosupresora.

#### 6.3.4 Efecto de diferentes polisacáridos

El Ejemplo describe el efecto de los polisacáridos distintos de dextrano 40 en la formulación de células sobre la viabilidad y la proliferación celulares.

##### Materiales y métodos

Se expandieron doce millones de células pluripotentes de la placenta  $\text{CD}10^{+}$ ,  $\text{CD}34^{-}$ ,  $\text{CD}105^{+}$ ,  $\text{CD}200^{+}$  crioconservadas en fábricas celulares de 10 bandejas de Nunc™, una para cada una de las formulaciones siguientes, a aproximadamente  $1,2 \times 10^8$  células. Se recogieron las células por incubación durante 10 min. a temperatura ambiente con tripsina/EDTA al 0,25%. Las células disociadas se transfirieron a un tubo de centrifuga de 500 ml que contenía 250 ml de suero bovino fetal (FBS) al 2% en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM). Las células se centrifugaron a 1040 RPM en tubos de 500 ml en una centrifuga Sorvall RC3BP. Las células se resuspendieron en solución salina al 0,9%/dextrano 40 al 5%. Las células se centrifugaron a 1420 RPM durante 10 min, y se suspendieron en 10 ml de las siguientes formulaciones:

*Formulación 1:* DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10% (Control)

*Formulación 2:* DMSO al 5%, maltodextrina al 5,5%, HSA al 10%

*Formulación 3:* DMSO al 5%, sacarosa al 5,5%, HSA al 10%

*Formulación 4:* DMSO al 5%, trehalosa al 5,5%, HSA al 10%

*Formulación 5:* DMSO al 5%, 55USP/ml de heparina, HSA al 10%

*Formulación 6:* DMSO al 5%, hetalmidón al 3,3%, HSA al 10%

*Formulación 7:* DMSO al 5%, glucógeno al 5,5%, HSA al 10%

*Análisis de retención en filtro:* Se evaluó la agregación celular mediante el uso de un análisis retención en filtro. La concentración celular se ajustó a aproximadamente  $1,2 \times 10^7$  células/ml antes de la filtración. La carga del filtro

(número de células por unidad de área de filtro) se mantuvo constante a aproximadamente  $2,4 \times 10^8$  células/filtro. Las células fueron crioconservadas en congelador de velocidad controlada Thermo a  $-70^\circ\text{C}$ . Las células se descongelaron antes de su uso, y las muestras se procesaron en breve después de la descongelación. Se tomó una muestra de 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células sin diluir tras la descongelación, se diluyó con 900  $\mu\text{l}$  de solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se realizaron los recuentos de células por duplicado utilizando un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California).

#### Resultados:

##### Agregación celular

Se evaluó la agregación celular dentro de cada formulación mediante el análisis de retención en filtro. Se determinó que las formulaciones 2-7 producían una agregación de células equivalente a, o por debajo de, formulación de control con DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, y HSA al 10% (FIG. 18.). La formulación 4, que comprendía trehalosa, la formulación 5, que comprendía heparina, y la formulación 7, que comprendía glucógeno, demostraron tasas de agregación de células sustancialmente por debajo de la formulación de control.

##### Viabilidad y recuperación tras la descongelación

Se evaluaron la viabilidad después de la descongelación, la recuperación de células viables y los datos de tamaño de las células a través de cada una de las formulaciones 1-7 para evaluar las capacidades crioprotectoras de las formulaciones. La viabilidad posterior a la descongelación se evaluó mediante un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell por exclusión de azul de tripán (Beckman Coulter, Fullerton, California). La viabilidad después de la congelación osciló entre 95,2% y 98,6%, con la sacarosa y el glucógeno en el extremo inferior del intervalo (FIG. 19). La formulación de dextrano de control dio como resultado una viabilidad celular de 98%. La recuperación de células viables después de la descongelación se calculó para descifrar las pérdidas de células en todo el proceso de congelación/descongelación, los valores oscilaron entre 84% y 115% a través de los diferentes polisacáridos (FIG. 20).

##### Fenotipo y funcionalidad

La capacidad de mantener el fenotipo  $\text{CD}10^+$ ,  $\text{CD}34^-$ ,  $\text{CD}105^+$ ,  $\text{CD}200^+$  de las células se sometió a ensayo en los diferentes polisacáridos por citometría de flujo. Las células formuladas en las formulaciones 2-4 y 6 mantuvieron este fenotipo aproximadamente tan bien como la formulación 1 de control, y entre 89,4% y 92,9% fueron  $\text{CD}105^+/\text{CD}200^+$ . La expresión de  $\text{CD}10^+/\text{CD}34^-$  fue  $> 95\%$  para cada formulación. De las células congeladas en heparina, 85,4% mantuvieron fenotipo  $\text{CD}105^+/\text{CD}200^+$  (FIG. 21).

La funcionalidad celular se evaluó mediante el análisis de Reacción de células T con Esferas (BTR), que mide la capacidad de las células para suprimir una respuesta de las células T a esferas antigénicas. Las células formuladas en sacarosa mostraron una disminución de la supresión de células T en comparación con la de una desviación típica de 1 de un valor esperado derivado de 4 diferentes réplicas experimentales de una formulación de control convencional que comprendía dextrano 40 (FIG. 22). A través de los otros polisacáridos, la supresión n de células T  $\text{CD}4$  y  $\text{CD}8$  cayó dentro de una desviación típica de 1 del valor esperado.

#### Conclusiones:

Con respecto a la agregación celular, la viabilidad después de la descongelación, la recuperación de células después de la descongelación y el mantenimiento del fenotipo, el uso de formulaciones que comprenden maltodextrano, trehalosa y hetalmidón dio como resultado poblaciones de células de la placenta que tenían aproximadamente las mismas características que el uso de la formulación con dextrano 40. Como tal, si bien las formulaciones que comprenden sacarosa, heparina o glucógeno se pueden utilizar para formular células madre de la placenta  $\text{CD}10^+$ ,  $\text{CD}34^-$ ,  $\text{CD}105^+$ ,  $\text{CD}200^+$ , se prefiere el uso de formulaciones que comprenden dextrano 40, maltodextrano, trehalosa o hetalmidón.

##### 6.3.5 Efecto de la proteína alternativa a HSA

Este Ejemplo demuestra que en una formulación con dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10% y DMSO al 5%, la concentración de albúmina de suero humano se puede reducir, y que la HSA puede estar sustituida por albúmina de suero bovino o suero bovino fetal.

La formulación 1 (F1) está compuesta por dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10% y DMSO al 5%. Con el fin de comprender el papel de HSA en F1 y conocer su impacto sobre las composiciones de células, se sometieron a ensayo formulaciones alternativas con proteínas del mismo tipo similares a la albúmina de suero humano, es decir, albúmina de suero bovino (BSA) y suero bovino fetal (FBS).

##### Materiales y métodos

Se expandieron doce millones de células pluripotentes de la placenta  $\text{CD}10^+$ ,  $\text{CD}34^-$ ,  $\text{CD}105^+$ ,  $\text{CD}200^+$  crioconservadas en fábricas celulares de 10 bandejas de Nunc™, una para cada una de las formulaciones

siguientes, a aproximadamente  $1,2 \times 10^8$  células. Se recogieron las células por incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente con tripsina/EDTA al 0,25%. Las células disociadas se transfirieron a un tubo de centrifuga de 500 ml que contenía 250 ml de suero bovino fetal al 2% (FBS) en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM). Las células se centrifugaron a continuación a 1040 RPM en tubos de 500 ml en una centrifuga Sorvall RC3BP. Las células se resuspendieron en solución salina al 0,9%/solución de dextrano 40 al 5%. Las células se centrifugaron a 1420 RPM durante 10 min, y se suspendieron en 10 ml de las siguientes formulaciones:

Formulación 1: DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10% (control)

Formulación 2: DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, HSA al 4%

Formulación 3: DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, BSA al 10%

Formulación 4: DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, FBS al 10%

*Análisis de retención en filtro:* Se evaluó la agregación celular mediante el uso del análisis retención en filtro. La concentración celular se ajustó a aproximadamente  $1,2 \times 10^7$  células/ml antes de la filtración. La carga del filtro (número de células por unidad de área de filtro) se mantuvo constante a aproximadamente  $2,4 \times 10^8$  millones de células/filtro. Las células se crioconservaron en un congelador de velocidad controlada Thermo a  $-70^\circ\text{C}$ . Las células se descongelaron antes de su uso, y las muestras se procesaron en breve después de la descongelación. Se tomó una muestra de 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células sin diluir tras la descongelación, se diluyó con 900  $\mu\text{l}$  de solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se realizaron por duplicado los recuentos de células utilizando un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California).

*Resultados:*

#### Agregación celular

La agregación celular, medida mediante Análisis de Retención en Filtro (FRA), era igual o menor de 100 píxeles por milímetro cuadrado para todas las condiciones (FIG. 23). Sin embargo, la HSA al 10% y la BSA al 10% parecían producir claramente menos agregados que la HSA al 4% y el FBS al 10%.

Con el fin de comprender la capacidad crioprotectora de cada solución, se evaluaron la viabilidad tras la descongelación, la recuperación y el tamaño de las células mediante el uso de la exclusión de azul de tripán en un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California). La viabilidad después de la descongelación a través de cada condición estaba dentro de la variabilidad del análisis y variaba de 95% a 98% de viables (FIG. 24). Del mismo modo, la recuperación de células después de la descongelación era comparable a la del control de HSA al 10%, con valores que oscilaban de 100 a 127% (FIG. 25).

#### Fenotipo y funcionalidad

Se sometió a ensayo la capacidad de mantener el fenotipo  $\text{CD}10^+$ ,  $\text{CD}34^-$ ,  $\text{CD}105^+$ ,  $\text{CD}200^+$  de las células a través de las diferentes formulaciones por citometría de flujo. (FIG. 26 y 27). Las células formuladas en las formulaciones 2-4 mantuvieron este fenotipo aproximadamente tan bien como la formulación de control con HSA al 10%, con valores que oscilaban de 88,2% a 93,5% de las células sometidas a ensayo. La expresión de  $\text{CD}10^+/\text{CD}34^-$  fue  $> 95\%$  para cada formulación.

La funcionalidad celular se midió a través del análisis de Reacción de las células T con Esferas. En comparación con las demás condiciones la supresión de las células T  $\text{CD}4$  y  $\text{CD}8$  fue elevada cuando las células se formularon en FBS con valores que caían dentro de desviaciones típicas de 1,5 del valor esperado derivado de 4 diferentes réplicas experimentales de una formulación de control convencional que comprendía HSA al 10% (FIG. 28). En todas las demás condiciones la supresión estaba dentro de una desviación típica de 1 del valor esperado.

Conclusiones:

Los resultados anteriores demuestran que HSA al 4%, BSA al 10%, o FBS al 10% pueden ser sustituidos por HSA al 10% sin pérdida apreciable de la viabilidad celular, la recuperación de células después de la descongelación, la degradación del fenotipo  $\text{CD}10^+$ ,  $\text{CD}34^-$ ,  $\text{CD}105^+$ ,  $\text{CD}200^+$ , o la actividad inmunosupresora. Por lo tanto, un intervalo de HSA, BSA y FBS al menos entre aproximadamente 4% y aproximadamente 10%, es particularmente adecuado para las formulaciones descritas en la presente memoria.

#### 6.3.6 Compatibilidad con diferentes tipos de células

El Ejemplo demuestra que las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea y las células asesinas naturales se pueden formular de la misma manera que las células pluripotentes de la placenta. Por lo tanto, este Ejemplo muestra que otras células, además de las células pluripotentes de la placenta, se pueden formular de la manera presentada en la presente memoria.

Métodos y materiales:

Las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMMSC) y las células asesinas naturales (NK) se expandieron y se recogieron utilizando las siguientes formulaciones:

F1:

5 Cultivo de células durante 3 días, seguido de la recogida y la resuspensión de las células en DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10%, filtración de células a través de un filtro de 70  $\mu\text{m}$ , y crioconservación de las células a aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células/ml; y

F2:

10 Cultivo de células durante cuatro días, seguido de la recogida y la resuspensión de las células en Plasmalyte A que comprende DMSO al 5% y HSA al 10%.

15 Las células se congelaron a  $-70^\circ\text{C}$  utilizando un congelador de velocidad controlada. Las BMMSC fueron crioconservadas en bolsas de 20 ml en la formulación F2 y bolsas de 10 ml en la formulación F1; y las células NK  $\text{CD}3^-$ ,  $\text{CD}56^+$  fueron crioconservadas en bolsas de 10 ml en la formulación F2 y en viales de 1,5 ml en la formulación F1. Estas muestras se descongelaron posteriormente y se analizaron para determinar los efectos de la congelación de la formulación sobre las características celulares.

20 *Análisis de Retención en Filtro:* Se evaluó la agregación celular mediante el uso del análisis de retención en filtro. La concentración celular se ajustó a aproximadamente  $1,2 \times 10^7$  células/ml antes de la filtración. La carga del filtro (número de células por unidad de área de filtro) se mantuvo constante a aproximadamente  $2,4 \times 10^8$  millones de células/filtro. Las células fueron crioconservadas en un congelador de velocidad controlada Thermo a  $-70^\circ\text{C}$ . Las células se descongelaron antes de su uso, y las muestras se procesaron en breve después de la descongelación. Se tomó una muestra de 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células sin diluir tras la descongelación, se diluyó con 900  $\mu\text{l}$  de solución salina tamponada con fosfato (PBS), y los recuentos de células se realizaron por duplicado utilizando un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, California).

Resultados

25 *Viabilidad*

Se utilizaron muestras después de la descongelación para determinar la viabilidad de las células congeladas en condiciones diferentes. La viabilidad de las BMMSC y las células NK no se vio afectada significativamente por las condiciones de congelación.

*Fenotipo*

30 Los marcadores NK se analizaron para determinar los efectos de las formulaciones F1 y F2 sobre el fenotipo de NK ( $\text{CD}3^-$ ,  $\text{CD}56^+$ ). Las dos formulaciones utilizadas no afectaron significativamente al porcentaje de células NK que mostraban el fenotipo NK. Las BMMSC también se analizaron para determinar la expresión de  $\text{CD}10$ ,  $\text{CD}34$ ,  $\text{CD}44$ ,  $\text{CD}45$ ,  $\text{CD}90$ ,  $\text{CD}98$ ,  $\text{CD}105$ ,  $\text{CD}117$ ,  $\text{CD}166$ ,  $\text{CD}200$ , pan-citoqueratina, y KDR. La expresión, o la falta de expresión, de estos marcadores no variaron significativamente en las BMMSC formuladas en las formulaciones F1 o F2.

*Agregación celular*

40 En el Análisis de Retención en Filtro, se realizaron dos réplicas de cada una de las formulaciones de BMMSC, y una réplica del análisis de las formulaciones de NK. La formulación F1 produjo significativamente menos agregados que la formulación F2 tanto para las BMMSC como para las células NK; el efecto de la formulación F2, sin embargo, fue más pronunciado para las BMMSC que para las células NK (FIG. 29).

Conclusiones:

45 Los resultados anteriores demuestran que las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea y las células asesinas naturales se pueden formular satisfactoriamente en DMSO al 5%, dextrano 40 al 5,5%, HSA al 10%, con una agregación celular, una viabilidad y una retención del fenotipo similares a los de las células pluripotentes de la placenta  $\text{CD}10^+$ ,  $\text{CD}34^+$ ,  $\text{CD}105^+$ ,  $\text{CD}200^+$  en la misma formulación. Además, para las células pluripotentes de la placenta, las formulaciones de BMMSC y células NK que contienen Plasmalyte muestran tasas de agregación celular significativamente mayores; como tales, se prefieren las formulaciones que contienen dextrano.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de elaboración de una composición que comprende células de mamífero, que comprende:
  - (a) poner en contacto dichas células con una solución que comprende (1) dextrano, maltodextrano, trehalosa o hetalmidón; y (2) albúmina de suero humano (HSA) para formar una solución que contiene células;
- 5 (b) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 micrómetros a 100 micrómetros; y
  - (c) si dicha solución que contiene células comprende más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, diluir dichas células a no más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro con una primera solución de dilución que comprende dextrano.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dichas células son criopreservadas tras la etapa (c).
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha solución en la etapa (a) comprende HSA al 10% (p/v).
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha primera solución de dilución comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v).
5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha primera solución de dilución comprende HSA al 10% (p/v).
6. El método de la reivindicación 1, en donde dicha solución en la etapa (a) o dicha primera solución de dilución comprenden adicionalmente un crioprotector.
- 15 7. El método de la reivindicación 6, en donde dicho crioprotector en dicha primera solución de dilución es DMSO.
8. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente después de la etapa (c):
  - (d) diluir la solución que contiene células con una segunda solución de dilución que comprende dextrano, maltodextrano, trehalosa o hetalmidón pero no comprende HSA, elaborando de ese modo una composición que comprende células de mamífero.
- 20 9. El método de la reivindicación 8, en donde dicha segunda solución de dilución comprende dextrano 40 al 5,5% o al 10% (p/v).
10. El método de la reivindicación 1, en donde dicho filtro es un filtro de 70 micrómetros o un filtro de 100 micrómetros.
- 25 11. El método de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dichas células de mamífero son células de la placenta adherentes humanas aisladas.
12. El método de la reivindicación 11, que comprende:
  - (a) suspender una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas en una solución de dextrano 40 al 5,5% (p/v), albúmina de suero humano (HSA) al 10% (p/v) para formar una solución que contiene células;
  - 30 (b) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 micrómetros a 100 micrómetros;
  - (c) diluir la solución que contiene células en dextrano 40 al 5,5% (p/v), HSA al 10% (p/v), y DMSO al 5% a no más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro;
  - (d) criopreservar las células;
  - 35 (e) descongelar las células; y
  - (f) diluir opcionalmente la solución que contiene las células de 1:1 a 1:11 con dextrano 40 al 10% (p/v) para producir dicha composición.
13. El método de la reivindicación 11, que comprende:
  - (a) centrifugar una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas para recoger las células;
  - 40 (b) resuspender las células en dextrano 40 al 5,5% (p/v);
  - (c) centrifugar las células para recoger las células;
  - (d) resuspender las células en una solución de dextrano 40 al 5,5% (p/v) que comprende albúmina de suero humano (HSA) al 10% (p/v) para formar una solución que contiene células;

- (e) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 micrómetros a 100 micrómetros;
- (f) diluir la solución que contiene células en dextrano 40 al 5,5% (p/v), HSA al 10% (p/v), y DMSO al 5% a no más de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro;
- (g) crioconservar las células;
- 5 (h) descongelar las células; e
- (i) opcionalmente, diluir la solución que contiene células de 1:1 a 1:11 con dextrano 40 al 10% (p/v) para producir dicha composición.
14. El método de la reivindicación 11, que comprende:
- 10 (a) proporcionar una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas en una solución que comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v) y albúmina de suero humano al 10% (HSA) (p/v) para formar una solución que comprende células de la placenta adherentes humanas aisladas;
- (b) filtrar dicha solución que comprende células de la placenta adherentes humanas aisladas a través de un filtro de 70 micrómetros a 100 micrómetros para producir células de la placenta adherentes humanas aisladas filtradas;
- 15 (c) diluir dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas filtradas con una cantidad de una solución que comprende dextrano 40 al 5,5% (p/v), HSA al 10% (p/v) y dimetilsulfóxido al 5% (DMSO) suficiente para llevar dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas filtradas a  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro; y
- 20 (d) diluir dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas con dextrano 40 al 10% (p/v) a una razón de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:11 células de la placenta adherentes humanas aisladas:dextrano 40 para producir dicha composición.
15. El método de la reivindicación 11, que comprende
- (a) poner en contacto células de la placenta adherentes humanas aisladas con una solución que comprende dextrano al 5,5% (p/v) y albúmina de suero humano (HSA) al 10% (p/v);
- 25 (b) filtrar las células de la placenta adherentes humanas aisladas a través de un filtro de 70 micrómetros a 100 micrómetros; y
- (c) diluir dichas células de la placenta adherente humanas aisladas a  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro con una solución que comprende dextrano 40 al 10% (p/v),
- 30 en donde dicha composición no comprende macro-cúmulos de células, en donde un macro-cúmulo de células comprende una agregación de células mayor de aproximadamente 150 micrómetros.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en donde dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup>.
17. El método de la reivindicación 16, en donde dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup> son adicionalmente CD200<sup>+</sup>.
- 35 18. El método de la reivindicación 17, en donde dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> o CD90<sup>+</sup>.
19. El método de la reivindicación 17, en donde dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>.
20. Una composición obtenible por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
21. La composición de la reivindicación 20, que comprende una pluralidad de células de la placenta adherentes humanas aisladas en una solución que comprende dextrano 40 al 4-10% (p/v), en donde dicha composición comprende entre  $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$  células por mililitro y  $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$  células por mililitro, y en donde dicha composición no comprende macro-cúmulos de células, en donde un macro-cúmulo de células comprende una agregación de células mayor de aproximadamente 150 micrómetros.
- 40 22. La composición de la reivindicación 21, en donde dicha composición comprende menos de aproximadamente 100 micro-cúmulos de células por  $10^6$  células.
- 45 23. La composición de la reivindicación 21, en donde dichas células de la placenta adherentes humanas aisladas son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup>.
24. La composición de la reivindicación 23, en donde dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup> son adicionalmente

CD200<sup>+</sup>.

25. La composición de la reivindicación 24, en donde dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> o CD90<sup>+</sup>.

5 26. La composición de la reivindicación 24 en donde dichas células CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>.

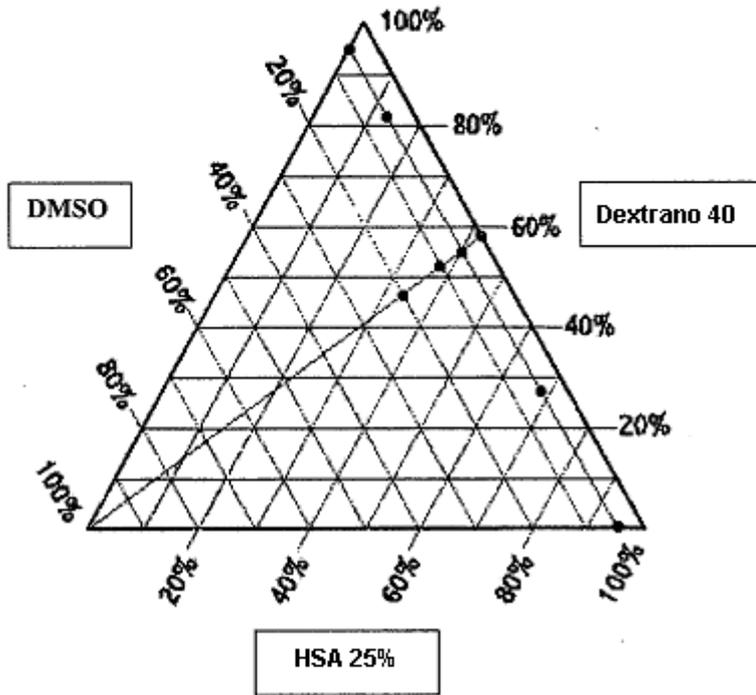


FIG. 1

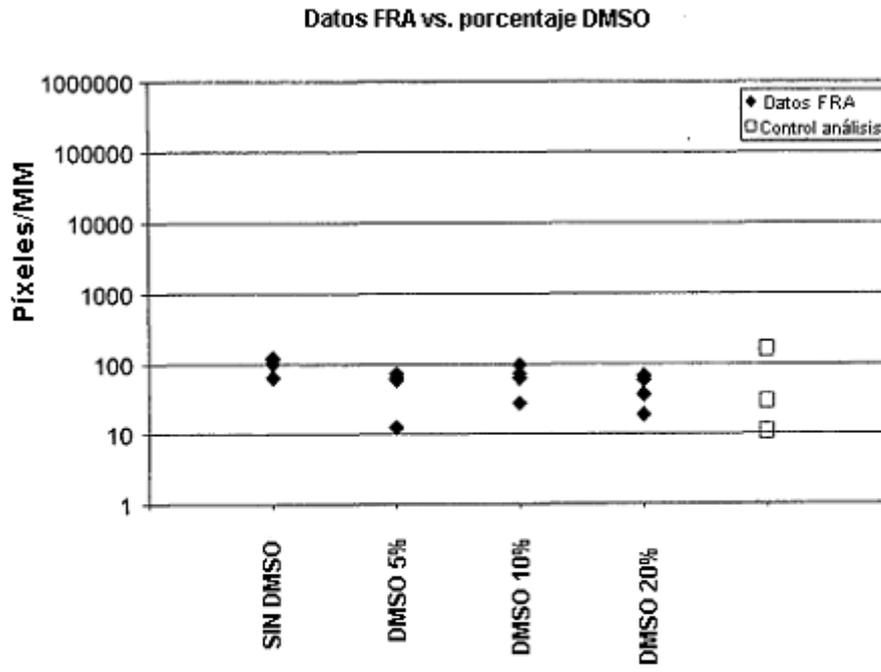


FIG. 2

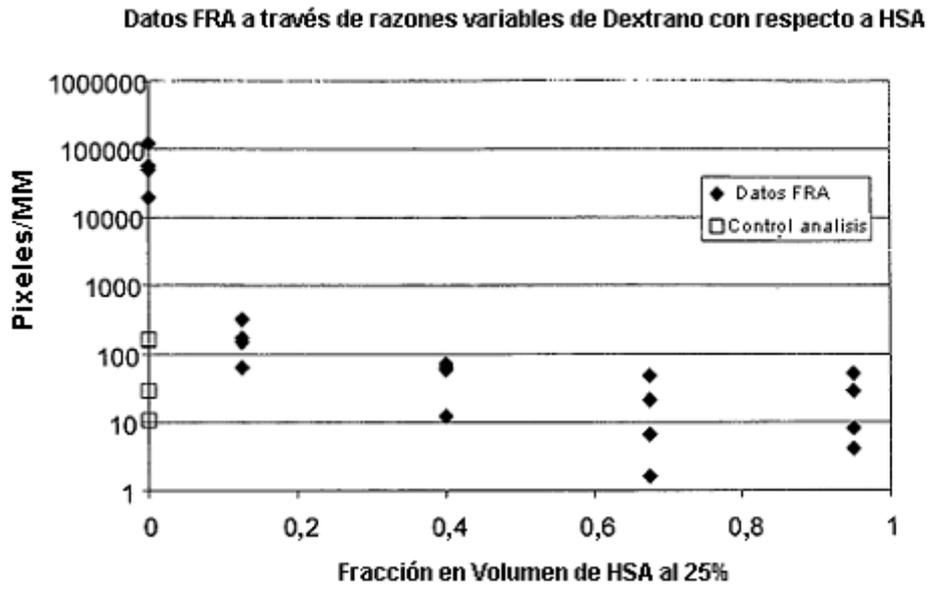


FIG. 3

Viabilidad después de la descongelación en la bolsa vs. porcentaje de DMSO

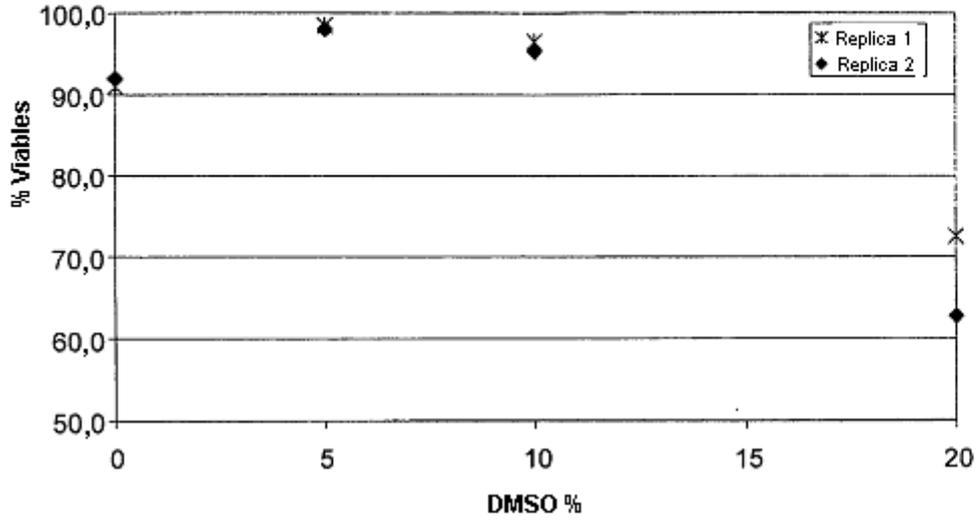


FIG. 4

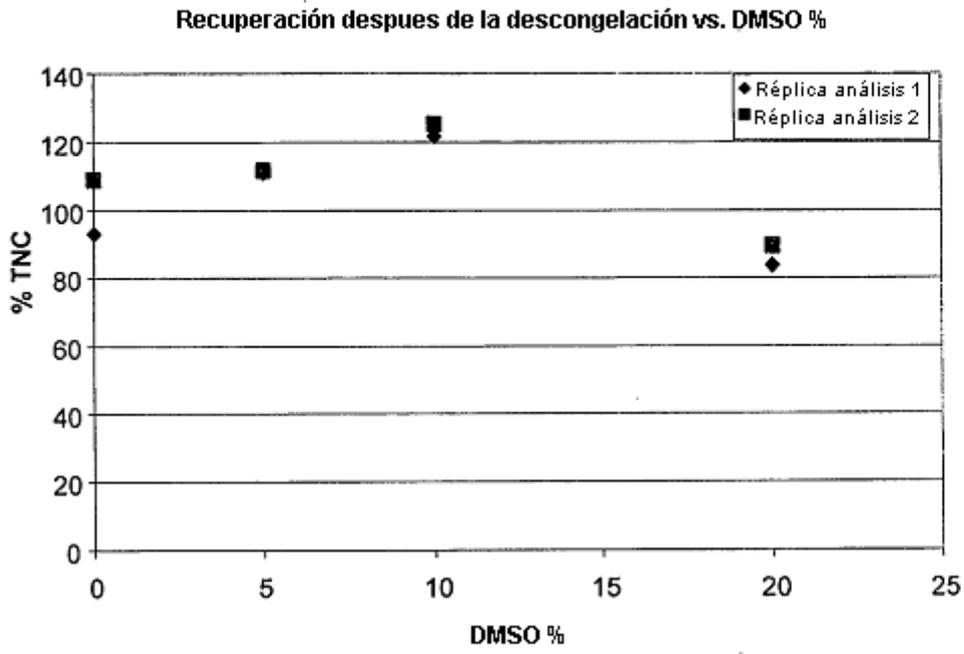


FIG. 5

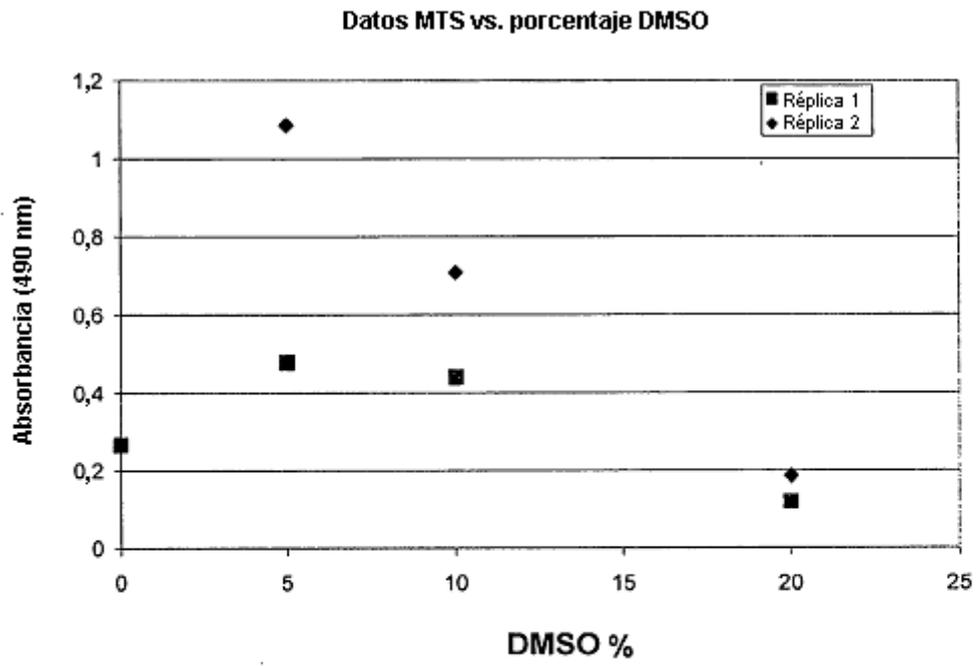


FIG. 6

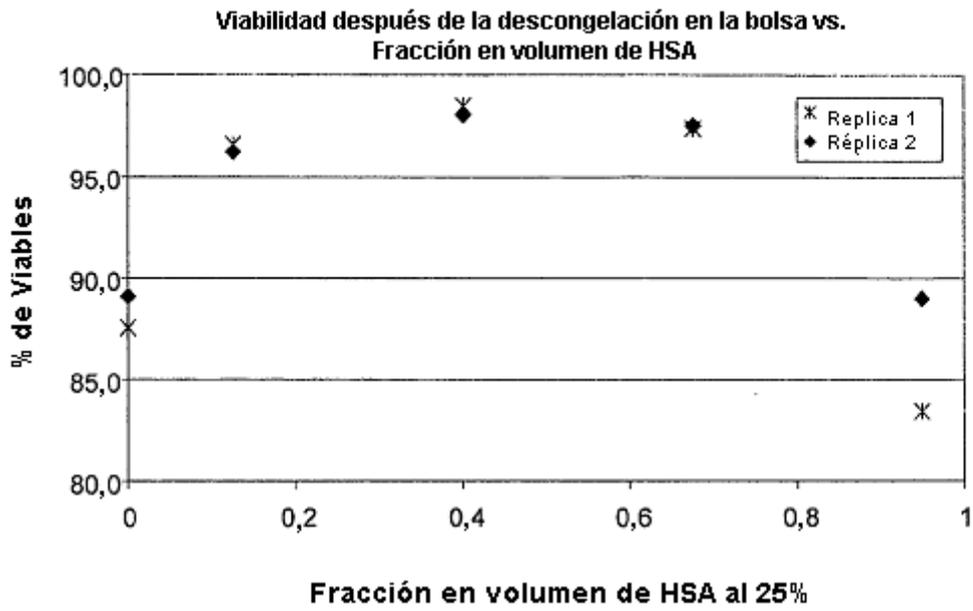


FIG. 7

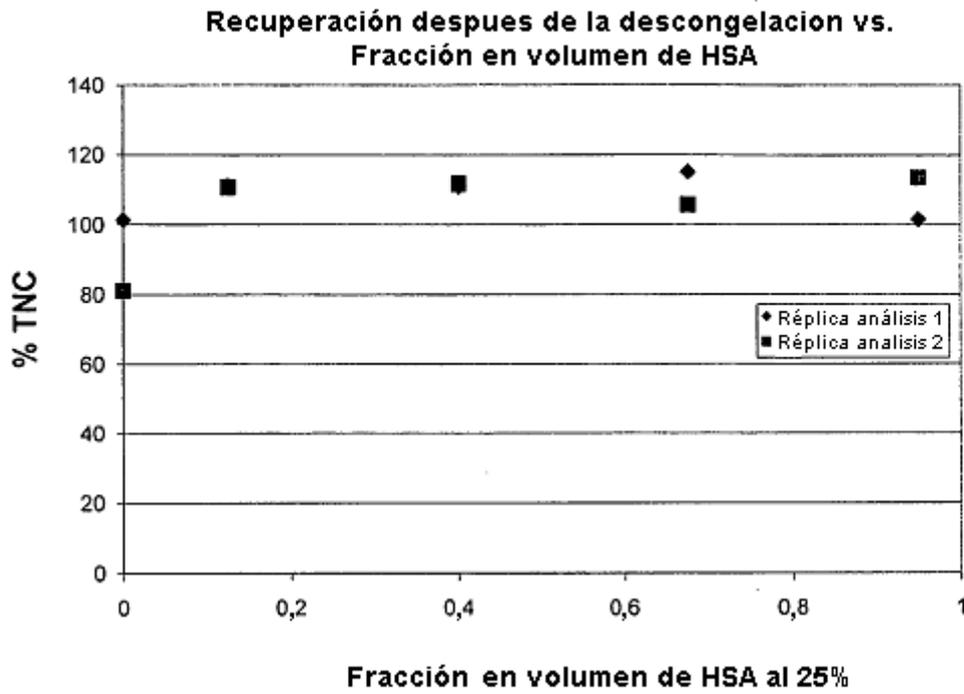
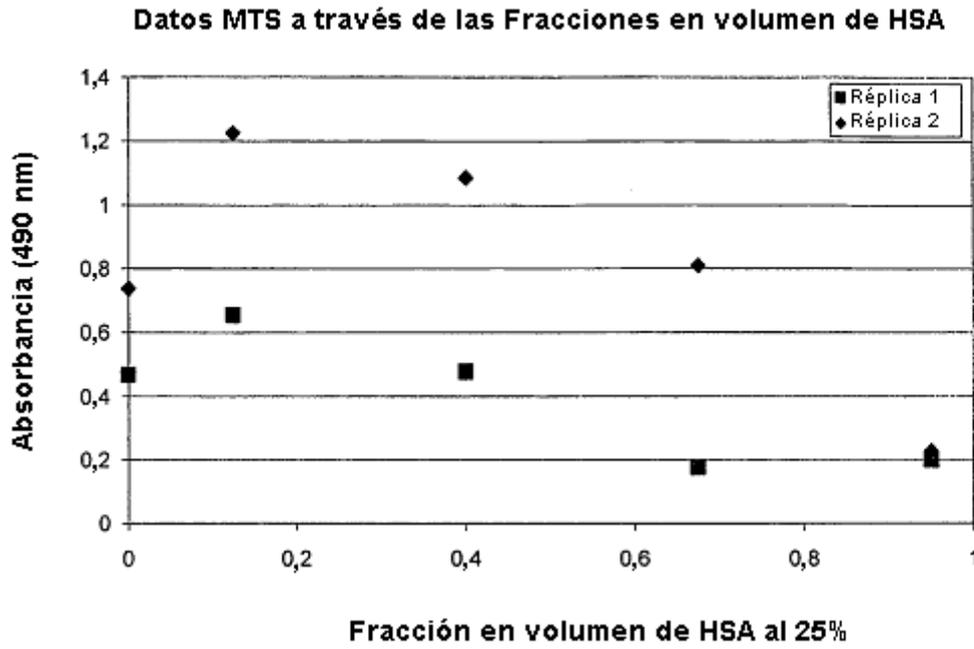


FIG. 8



**FIG. 9**

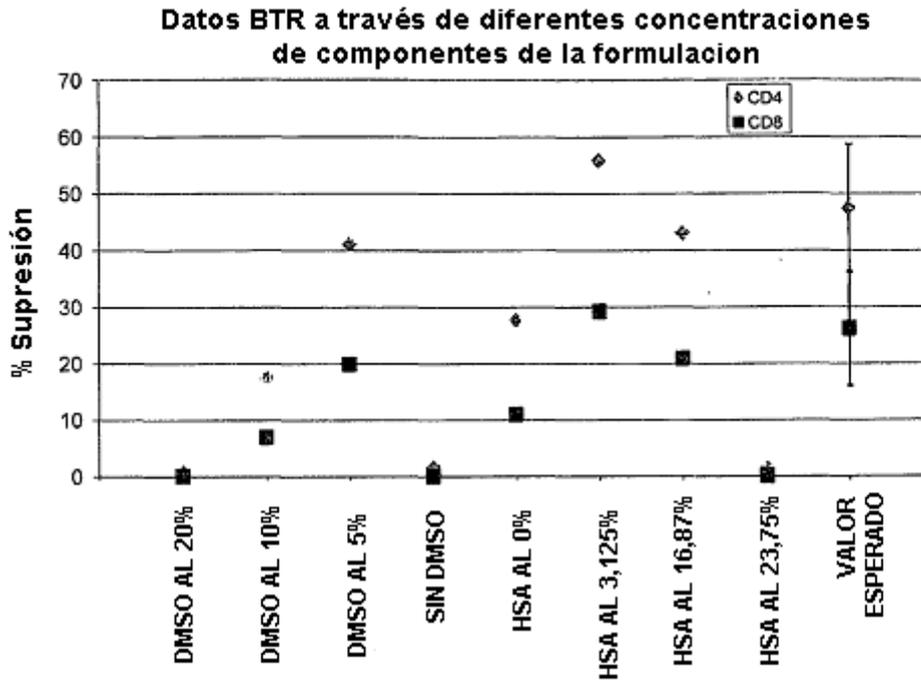


FIG. 10

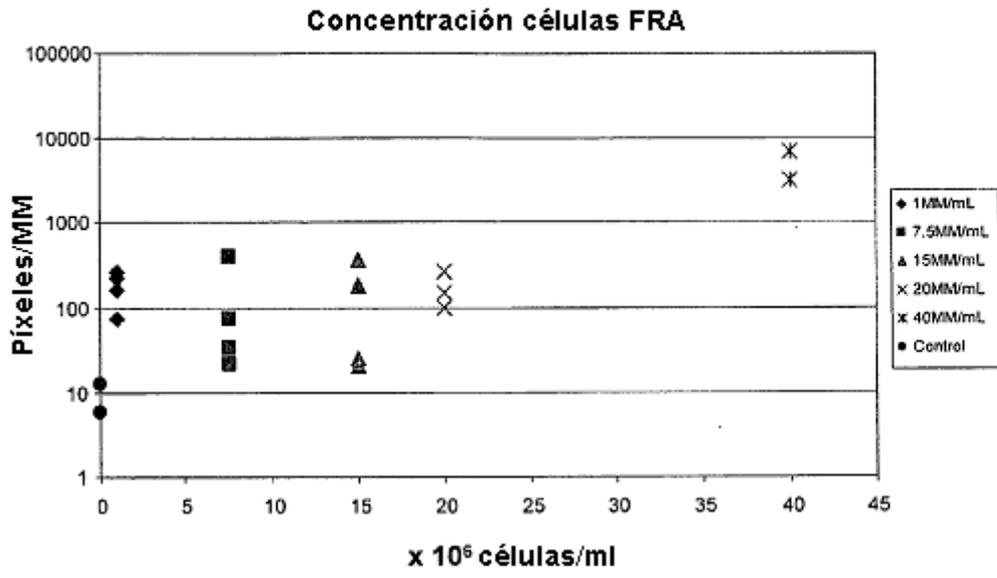


FIG. 11

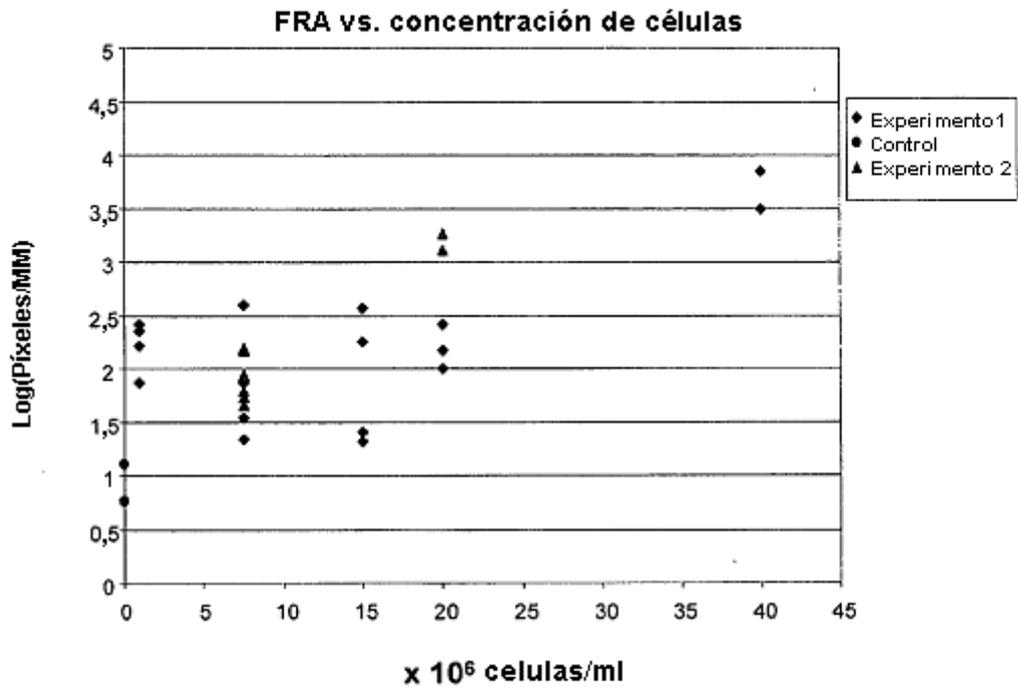


FIG. 12

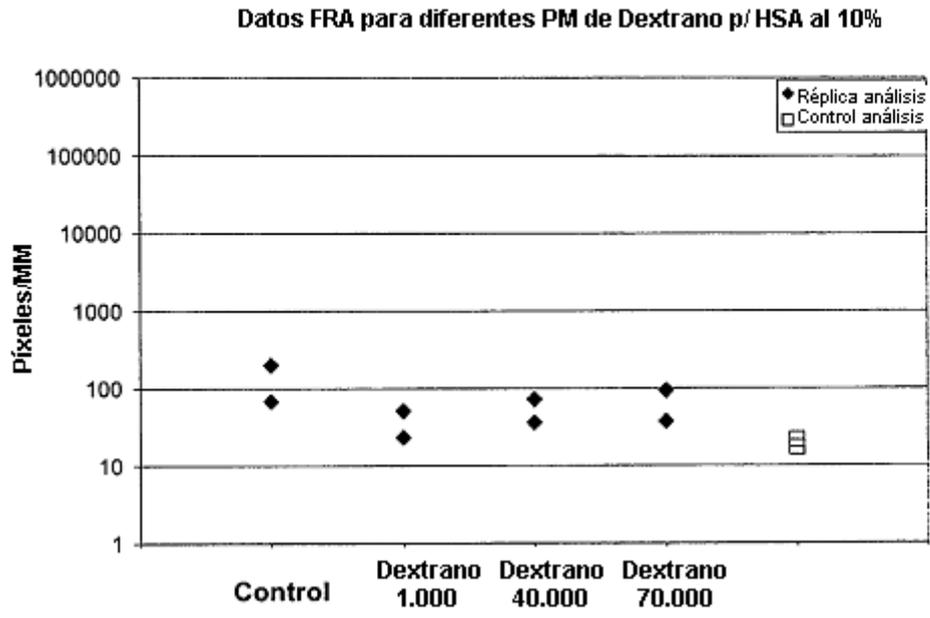


FIG. 13

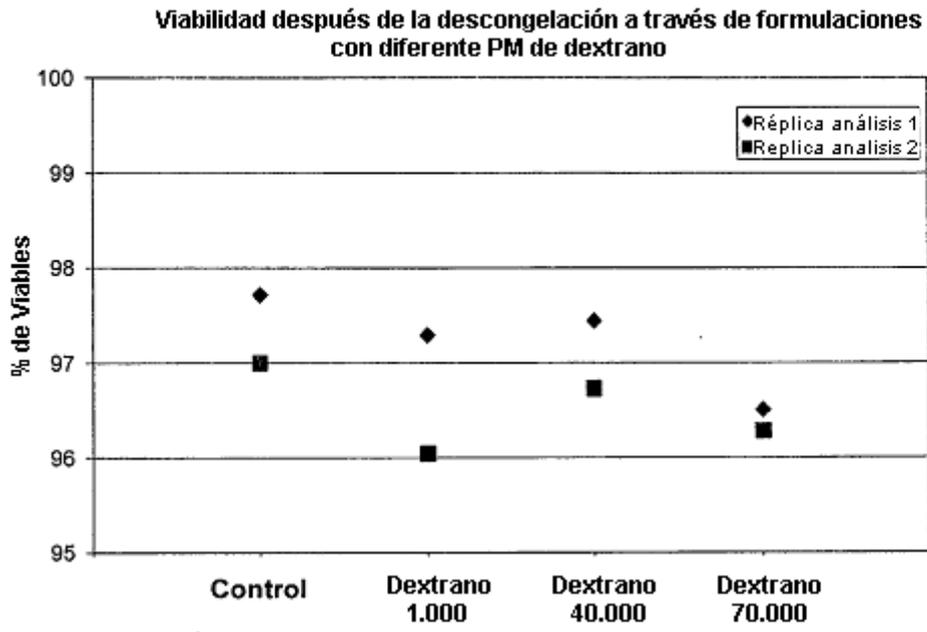


FIG. 14

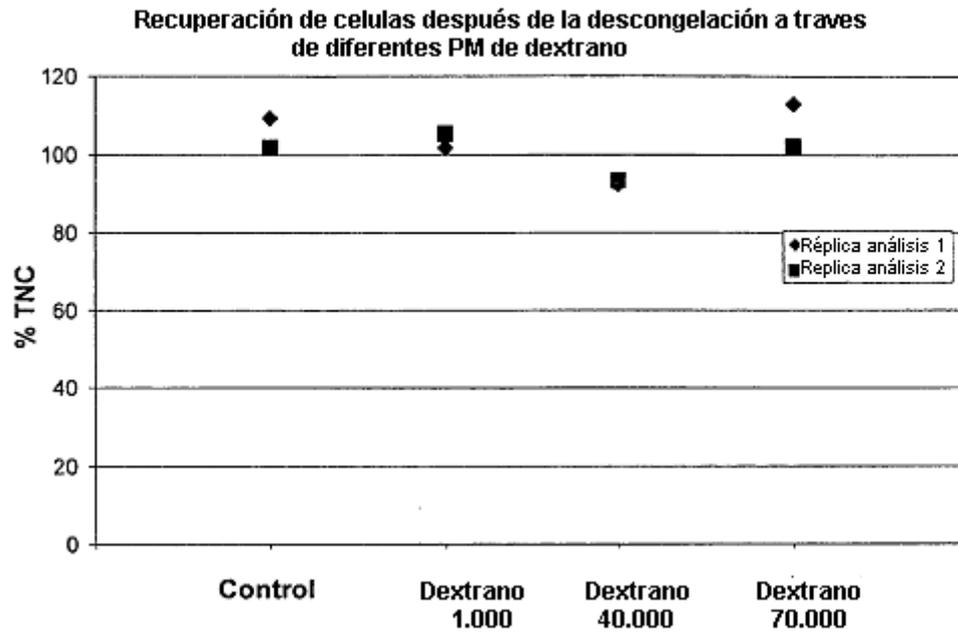


FIG. 15

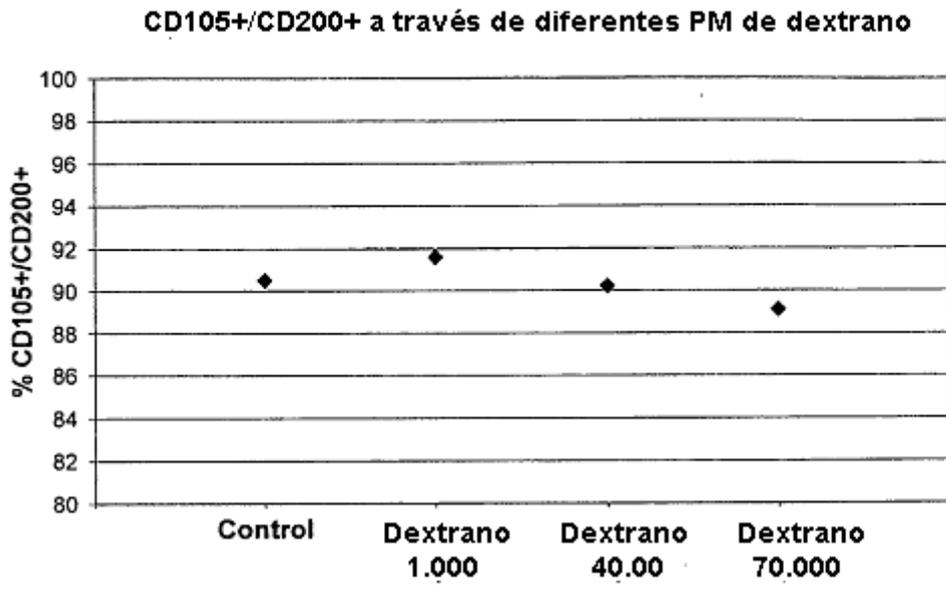


FIG. 16

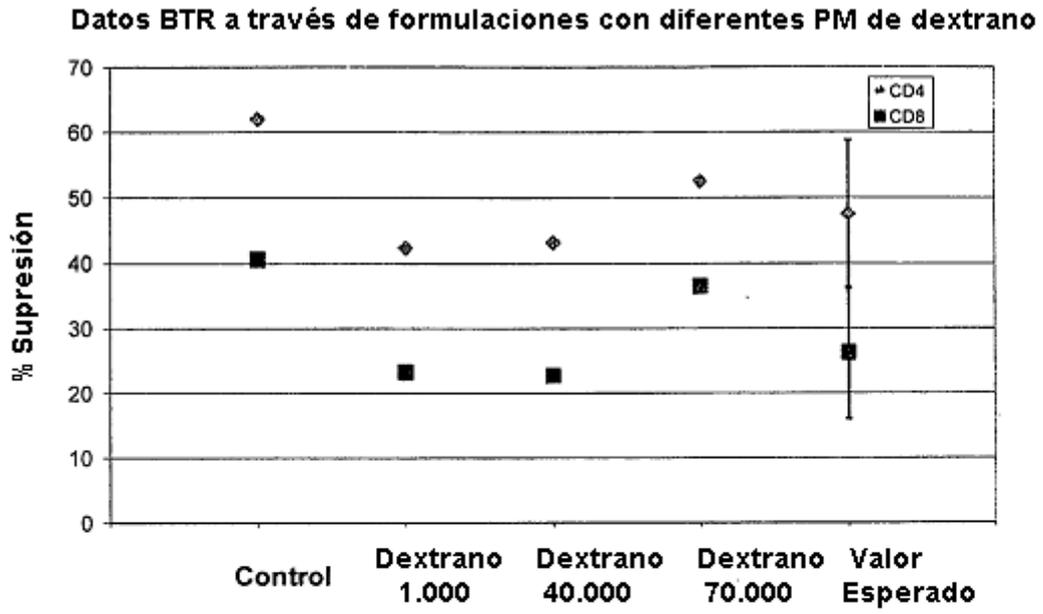


FIG. 17

FRA a través de formulaciones con diferentes polisacáridos

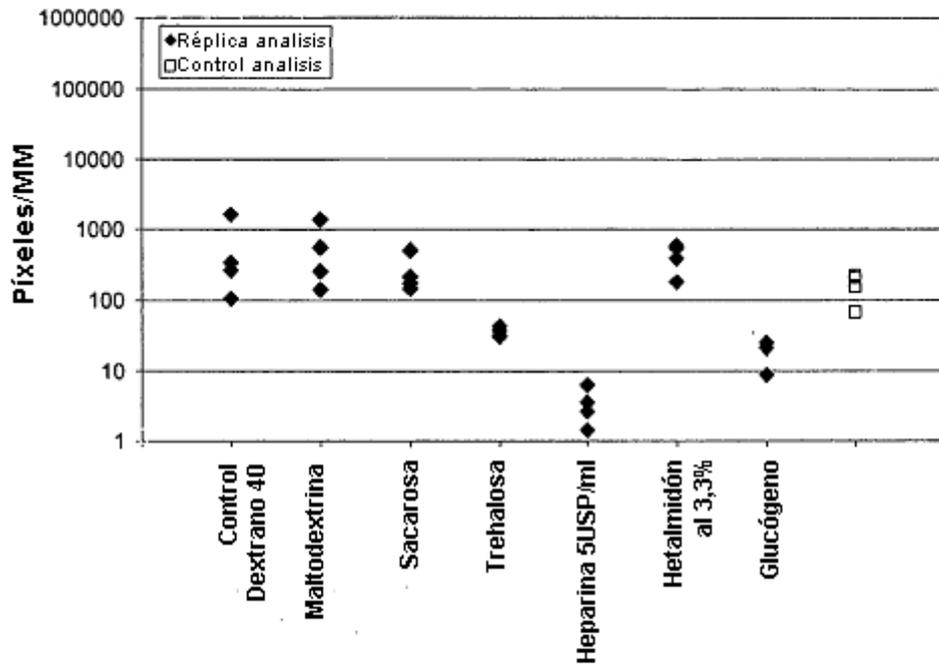


FIG. 18

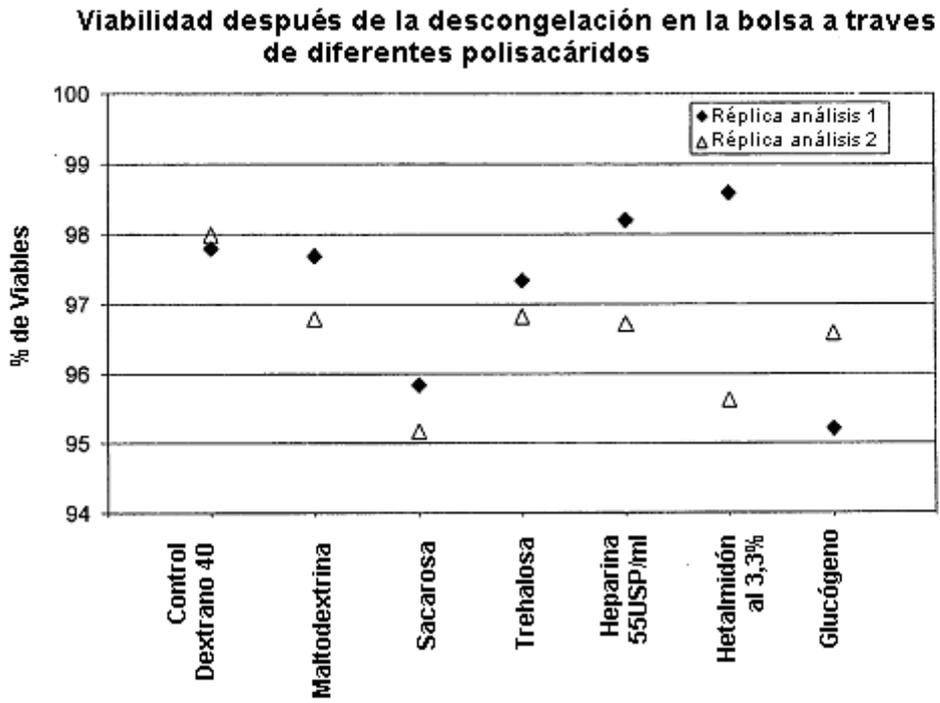


FIG. 19

**Recuperación de células viables después de la descongelación de la bolsa a través de diferentes polisacáridos**

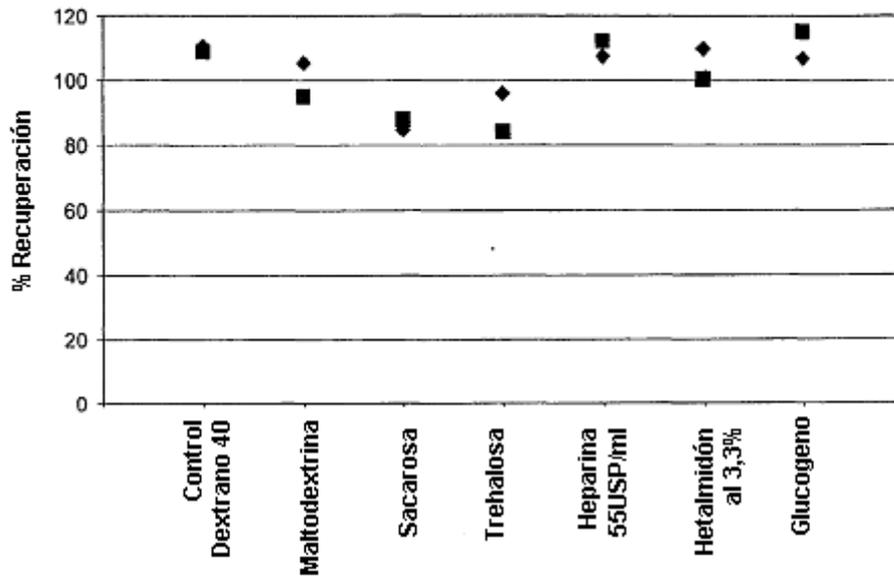


FIG. 20

Fenotipo a través de formulaciones con diferentes polisacáridos

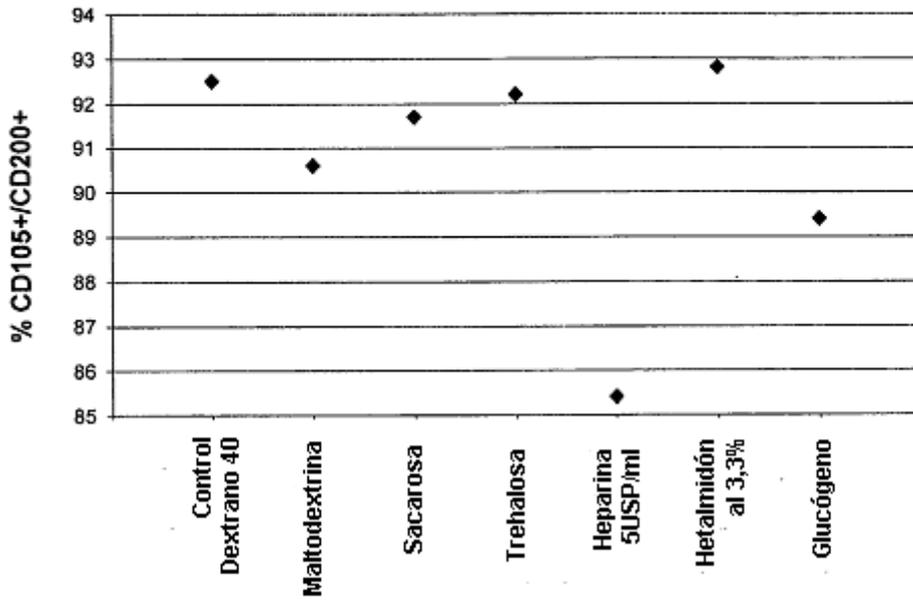


FIG. 21

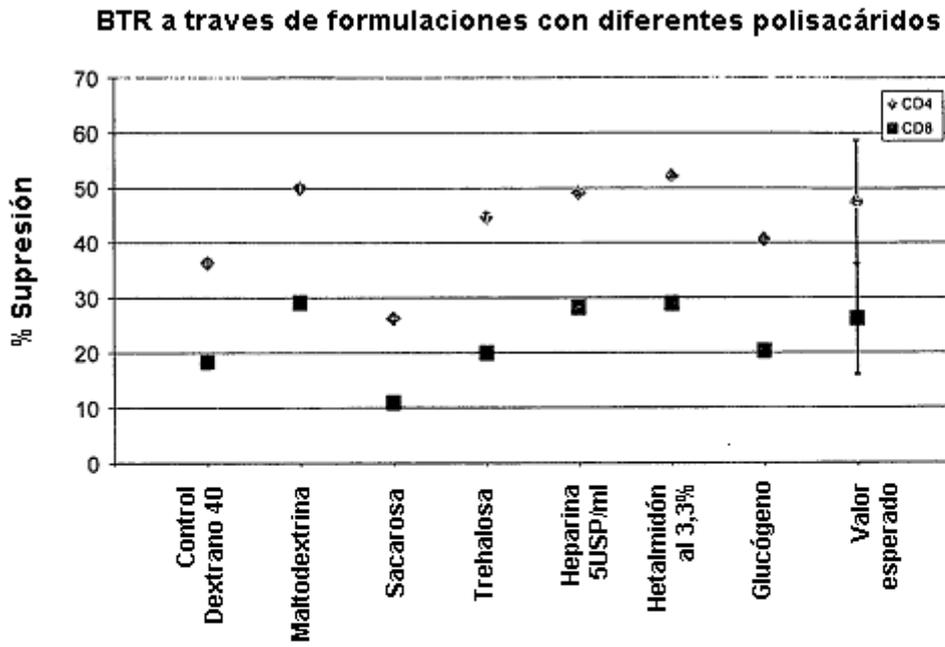


FIG. 22

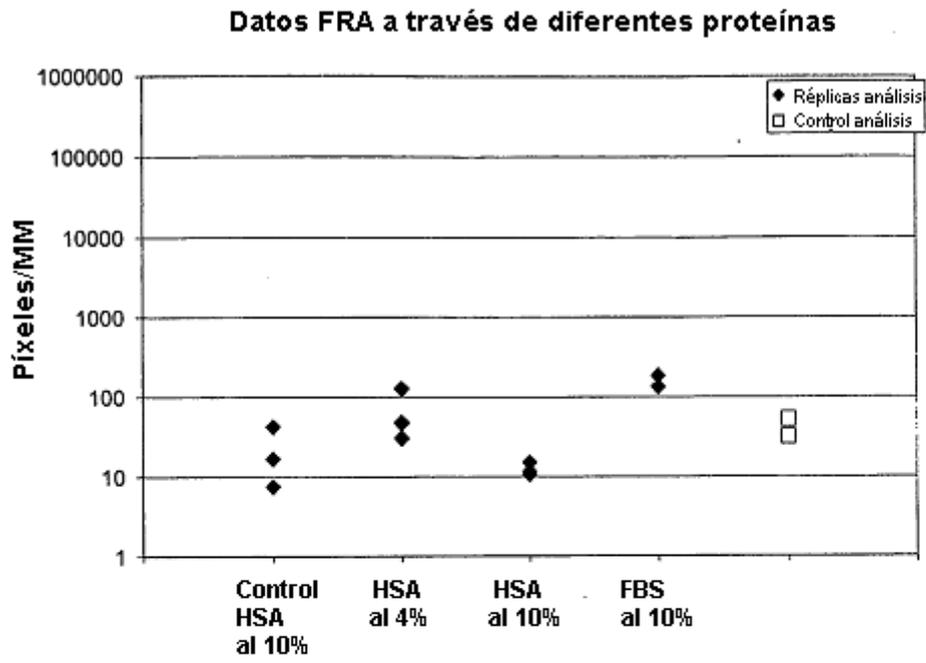


FIG. 23

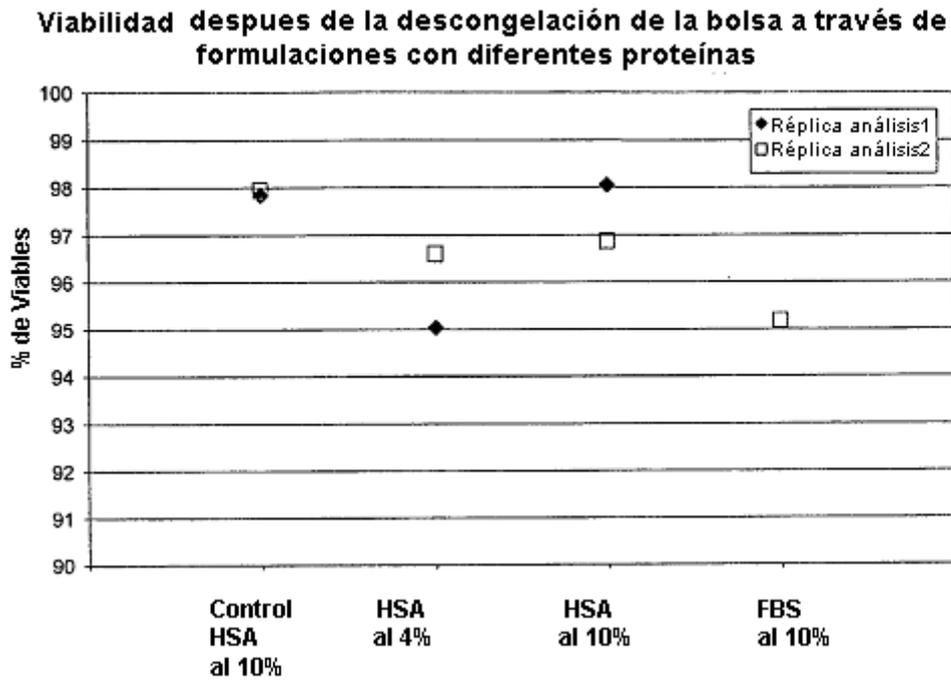


FIG. 24

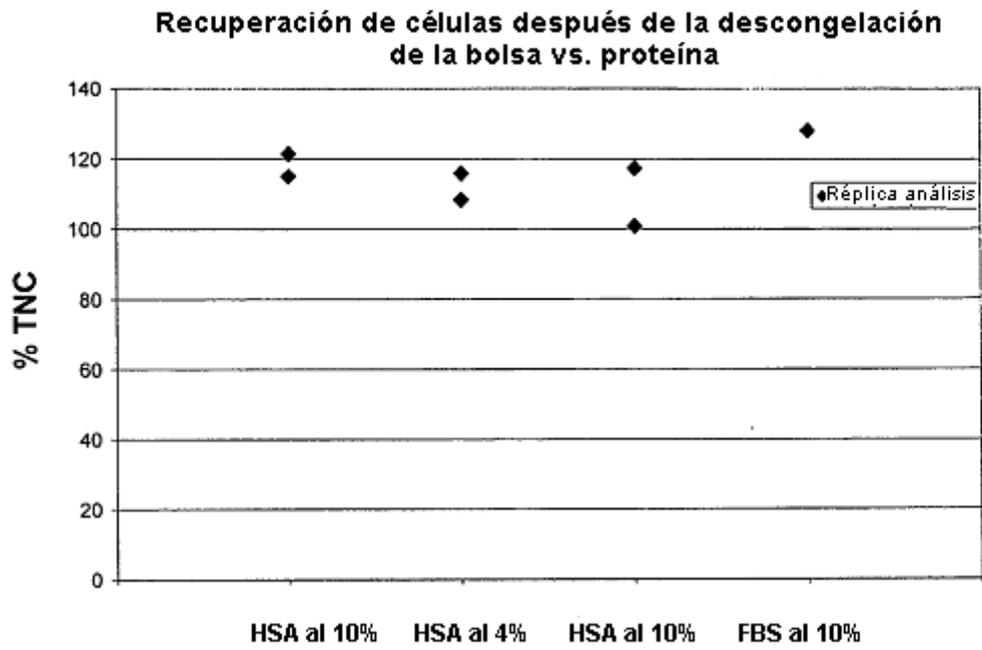


FIG. 25

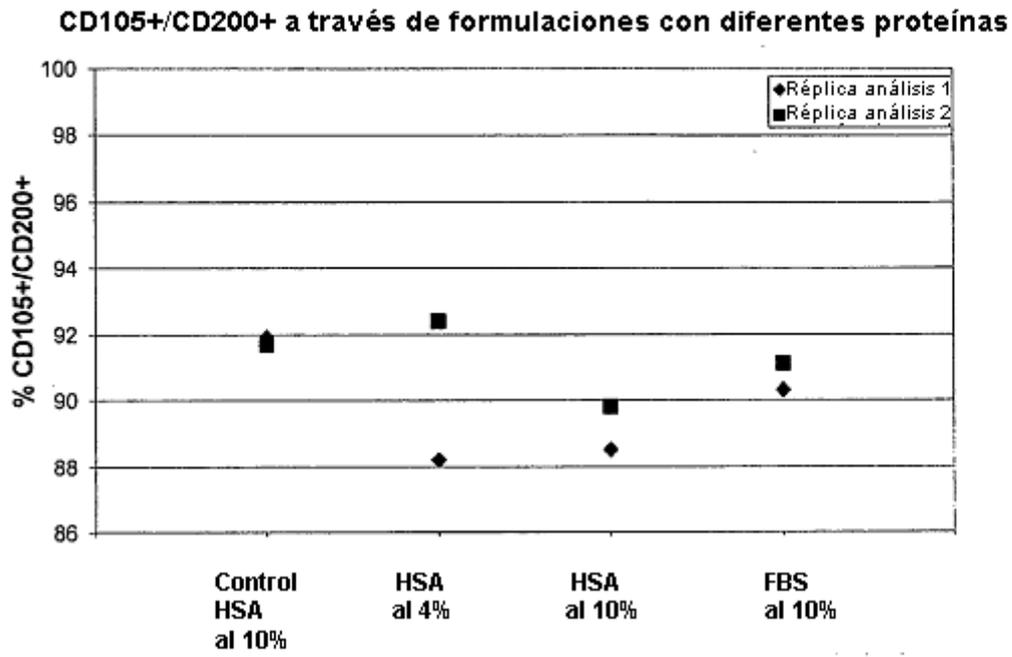


FIG. 26

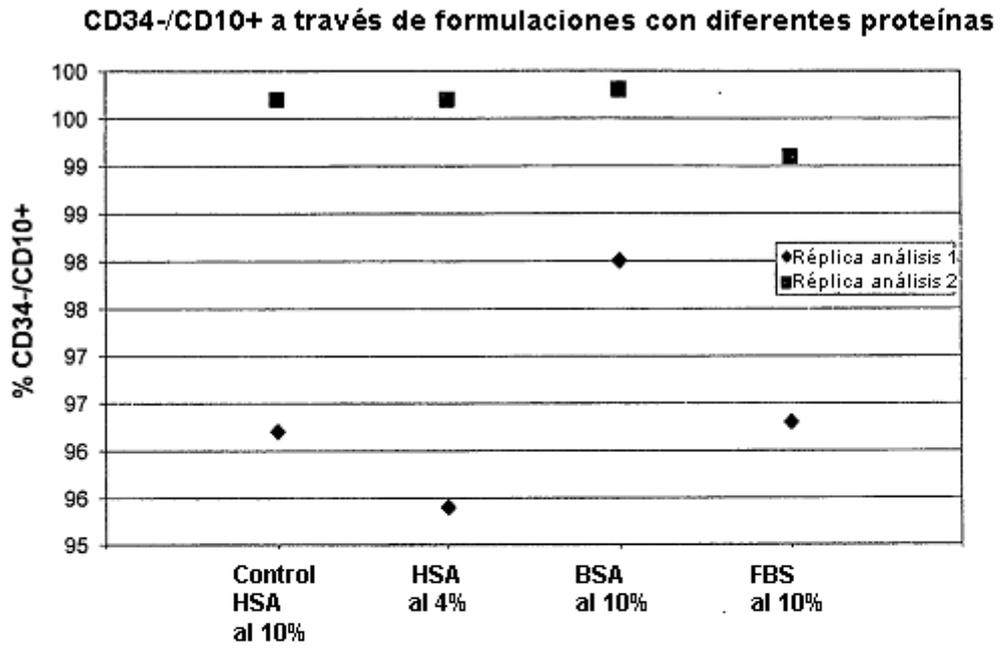


FIG. 27

Datos BTR a través de formulaciones con diferentes proteínas

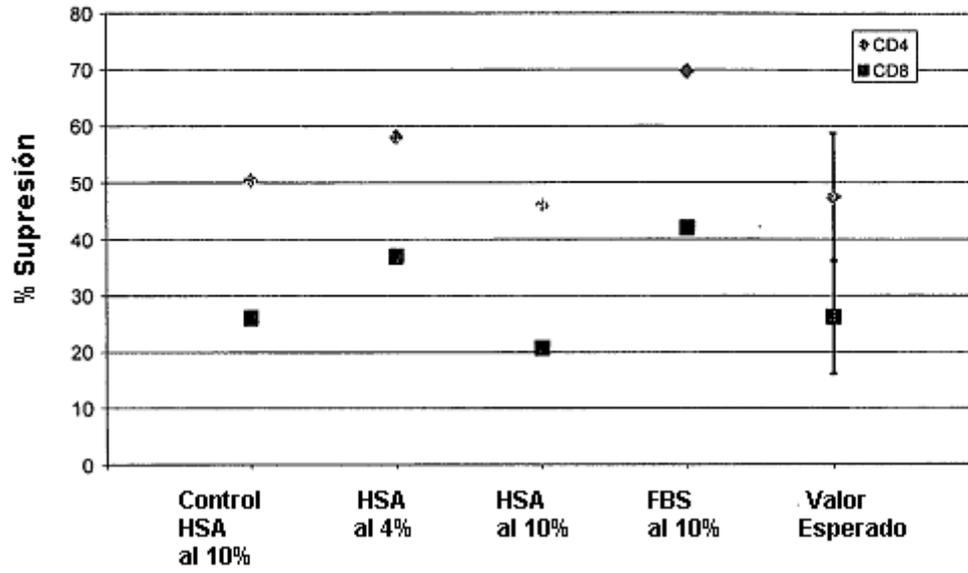


FIG. 28

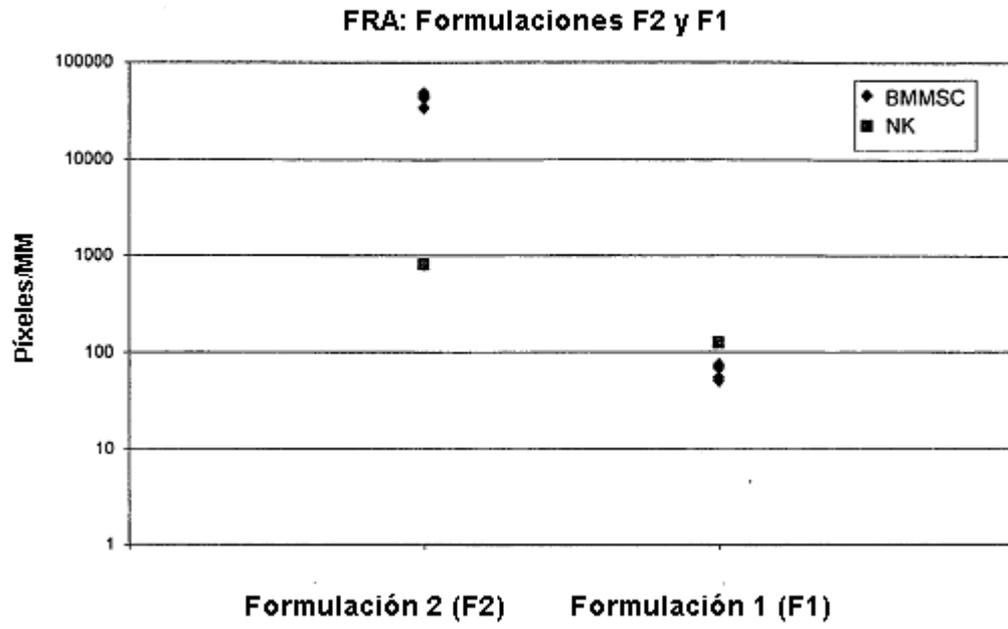


FIG. 29