(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 629 155**

(51) Int. Cl.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2002** **E 10183252 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2316463**

(54) Título: **Matrices de tejido que comprenden células madre placentarias, y métodos para su preparación**

(30) Prioridad:

14.02.2001 US 268560 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2017

(73) Titular/es:

ANTHROGENESIS CORPORATION (100.0%)
Hanover Technical Center 45, Horsehill Road
Cedar Knolls, NJ 07927, US

(72) Inventor/es:

HARIRI, ROBERT J.

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 629 155 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

Matrices de tejido que comprenden células madre placentarias, y métodos para su preparación

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

La presente invención radica generalmente en el campo de la ingeniería tisular, y más específicamente es un medio para la obtención de células madre para su siembra en armazones para la regeneración o reparación de tejido, hueso y otros órganos.

2. Descripción de la técnica anterior

La escasez de donantes de órganos humanos para trasplante es un problema creciente. A pesar de las agresivas campañas de sensibilización pública el número de donantes de órganos cualificados ha cambiado poco en los últimos 20 años mientras que la demanda ha crecido a un ritmo rápido. Además, el trasplante de órganos alogénico está aún asociado con una alta frecuencia de complicaciones debido al rechazo inmunológico. Los intentos de hacer frente a esta crisis han incluido el desarrollo de dispositivos de soporte de órganos sintéticos *ex vivo* e implantables tales como dispositivos de bomba para soporte cardiaco y el uso de órganos de otras especies (xenotrasplantes). El xenotrasplante que ha sido refinado para incluir el desarrollo de animales donantes quiméricos todavía sigue siendo imperfecto y estando sujeto a posibles consecuencias tales como la transmisión de zoonosis.

Las células madre humanas son células precursoras totipotenciales o pluripotenciales capaces de generar una variedad de linajes celulares humanos maduros. Esta capacidad sirve como base para la diferenciación celular y la especialización necesaria para el desarrollo de órganos y tejidos. El reciente éxito en el trasplante de estas células madre ha proporcionado nuevas herramientas clínicas para reconstituir y/o complementar la médula ósea después de la mieloablación debida a enfermedad, exposición a sustancias químicas tóxicas o radiación. Existe una evidencia adicional que demuestra que las células madre pueden ser empleadas para repoblar muchos, si no todos, los tejidos y restaurar la funcionalidad fisiológica y anatómica. La evidencia hasta la fecha indica que las células madre multipotentes o pluripotentes están dirigidas a diferenciarse a linajes específicos de células maduras basándose en el entorno físico y bioquímico en el que se liberan. También existe evidencia de que estas células pueden migrar de tejidos normales a anormales o defectuosos y repoblar esas zonas de manera muy centrada y específica.

La aplicación de células madre en la ingeniería tisular, la terapia génica y el tratamiento terapéutico celular también están avanzando rápidamente.

Se han caracterizado muchos tipos diferentes de células madre de mamíferos. Por ejemplo, se conocen las células madre embrionarias, las células germinales embrionarias, las células madre adultas u otras células madre o células progenitoras comprometidas. Ciertas células madre no sólo se han aislado y caracterizado, sino también se han cultivado en condiciones que permiten la diferenciación en una medida limitada.

A pesar de los considerables avances realizados en el control de la diferenciación de células madre a células y tejidos maduros, no se ha logrado el desarrollo real de la compleja arquitectura de los órganos sólidos. Por lo tanto, la ingeniería tisular ha prestado atención a tejidos componentes en desarrollo y a continuación al ensamblaje de esos componentes en estructuras útiles.

Por lo tanto es deseable proporcionar métodos para eliminar el contenido celular de los tejidos, mientras que se preserva la arquitectura de la matriz extracelular asociada a la comprensión avanzada de las células madre, que se pueden sembrar con células para producir órganos enteros con las características anatómicas y fisiológicas de los órganos nativos.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un método de fabricación de una matriz de tejido, que comprende sembrar células madre placentarias aisladas sobre o dentro de una matriz de tejido, en donde las células madre placentarias aisladas no expresan antígenos MHC clase 2, en donde dichas células madre placentarias son $SSAE3^-$, $SSAE4^-$, $OCT\text{-}4^+$ y $ABC\text{-}p^+$, en donde dichas células madre placentarias se obtienen por perfusión de una placenta mamífera con una solución de perfusión, en donde dicha placenta ha sido exanguinada y perfundida para eliminar la sangre residual y en donde dichas células madre placentarias han sido separadas de otras células en dicha solución de perfusión por tripsinización diferencial.

Además, la presente invención se refiere a una matriz de tejido que comprende células madre placentarias humanas, que son $SSEA3^-$, $SSEA4^-$, $OCT\text{-}4^+$ y $ABC\text{-}p^+$.

Los órganos sólidos cadavéricos son procesados para eliminar todos los componentes celulares vivos para conservar todavía el armazón de la matriz extracelular subyacente en preparación para la implantación de células madre alogénicas que repueblan el armazón tridimensional del órgano y restaurar la función anatómica y fisiológica

normal para fines de trasplante de órganos. En una realización preferida, las células se obtienen a partir de tejido placentario. El método para el procesamiento de órganos sólidos de cadáver agota selectivamente los componentes celulares del órgano a la vez que preserva la arquitectura bioquímica y tridimensional nativa de dicho órgano. En el armazón del órgano resultante o 'molde' se implantan después las células madre multipotentes vivas de genotipo específico que son liberadas mediante inyección intraparenquimatosa o por medio del árbol vascular del órgano. La liberación de estas células se realiza de una manera que promueve la diferenciación y la proliferación de los tipos de células maduras normales del órgano, estando guiados la distribución y el ensamblaje célula a célula final por el armazón de la matriz extracelular. La repoblación del armazón del órgano se lleva a cabo bajo condiciones de cultivo de ambiente controlado que proporcionan la inmersión en y la perfusión con el medio de cultivo de tejidos formulado para liberar los niveles de nutrientes y metabólicos óptimos necesarios para sostener el órgano, a la vez que se simulan esas fuerzas biomecánicas que se encuentran *in vivo.* El sistema controla el estado fisiológico y metabólico del órgano durante la repoblación y la renovación y ajusta las condiciones según sea necesario para mantener el estado de equilibrio óptimo. Los órganos repoblados pueden se mantenidos a continuación en estas condiciones de apoyo hasta el momento en que se puedan someter a ensayo y trasplantar.

La presente invención se refiere a métodos de fabricación de una matriz de tejido. Los métodos de la invención abarcan el uso de células madre de tipo embrionario obtenidas a partir de una placenta que ha sido tratada para eliminar la sangre del cordón residual para sembrar una matriz y cultivada en las condiciones apropiadas para permitir que las células madre se diferencien y pueblen la matriz. Las matrices de tejido obtenidas por medio de los métodos de la invención se pueden utilizar para una variedad de propósitos, incluyendo fines de investigación y terapéuticos.

De acuerdo con la presente invención, las células madre de tipo embrionario se obtienen a partir de una placenta que se ha exanguinado y perfundido durante un período de al menos de dos a veinticuatro horas después de la expulsión desde el útero para eliminar todas las células residuales. La placenta exanguinada se cultiva a continuación en las condiciones apropiadas para permitir la producción de células madre endógenas procedentes de la placenta.

Los métodos de la presente invención se refieren al uso de células madre de tipo embrionario que se han originado a partir de una placenta para sembrar una matriz. Una vez obtenidas a partir de una placenta cultivada, las células madre de tipo embrionario se pueden caracterizar mediante varios métodos, incluyendo pero no limitados a, inmunoquímica, y la presencia de marcadores de superficie celular concretos. Las células madre preferidas para ser utilizadas de acuerdo con la presente invención pueden ser identificadas por la presencia de los siguientes marcadores de superficie celular: CD10+, CD29+, CD34-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+, y APC-p+.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, las células madre se pueden diferenciar a linajes celulares específicos, incluyendo los linajes adipogénico, condrogénico, osteogénico, neurogénico y hepatogénico. En otra realización de la invención, puede ser preferible estimular la diferenciación de células madre de tipo embrionario a un linaje concreto, antes de la siembra de las células en una matriz concreta. De acuerdo con esta realización, las placentas cultivadas se pueden estimular para producir células de un linaje concreto, mediante la introducción en la placenta de células o tejidos exógenos del linaje deseado. Por ejemplo, antes de la siembra de células madre de tipo embrionario en una matriz u órgano descelularizado para la propagación y el crecimiento en el tejido del hígado, la placenta cultivada puede ser estimulada para producir células madre hepatogénicas mediante la introducción de células o tejidos hepatogénicos exógenos en la placenta.

La presente descripción también describe el uso de la placenta cultivada como biorreactor para estimular la propagación de las células madre de tipo embrionario de un linaje concreto. Por ejemplo, la placenta cultivada se puede estimular para producir células madre de tipo embrionario que se han destinado a un linaje concreto, incluyendo, pero no limitado a, linajes adipogénico, condrogénico, osteogénico, neurogénico y hepatogénico. De acuerdo con este aspecto de la descripción, la placenta cultivada se puede estimular para producir células de un linaje concreto, mediante la exposición de la placenta cultivadas a células o tejidos exógenos del linaje deseado.

A modo de ejemplo, y no a modo de limitación, con el fin de generar células de un linaje hepático, la placenta se puede exponer a células de hígado. De acuerdo con esta realización, las células de hígado se introducen en la placenta por medio de varios métodos, incluyendo la inyección de las células del hígado en forma de una suspensión de células individuales o en forma de islas de células en la vasculatura o directamente en la placenta. Después de la introducción de las células del hígado, la placenta se perfundiría de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria para permitir la recuperación de las células madre hepáticas a partir de la placenta.

Breve descripción de los dibujos

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

Las Figuras 2a-e son diagramas esquemáticos que muestran la recogida, la fijación, la perfusión, la recogida y el almacenamiento de una placenta drenada y perfundida.

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

La Figura 4 es un esquema de selección para la clasificación de células recuperadas de una placenta perfundida.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método de fabricación de una matriz de tejido, que comprende sembrar células madre placentarias aisladas sobre o dentro de una matriz de tejido, en donde las células madre placentarias aisladas no expresan antígenos MHC clase 2, en donde dichas células madre placentarias son SSAE3$^-$, SSAE4$^-$, OCT-4$^+$ y ABC-p$^+$, en donde dichas células madre placentarias se obtienen por perfusión de una placenta mamífera con una solución de perfusión, en donde dicha placenta ha sido exanguinada y perfundida para eliminar la sangre residual y en donde dichas células madre placentarias han sido separadas de otras células en dicha solución de perfusión por tripsinización diferencial.

Además, la presente invención se refiere a una matriz de tejido que comprende células madre placentarias humanas, que son SSEA3$^-$, SSEA4$^-$, OCT-4$^+$ y ABC-p$^+$.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "biorreactor" se refiere a un sistema *ex vivo* para la propagación de células, la producción o expresión de materiales biológicos y el desarrollo o cultivo de células, tejidos, organoides, virus y microorganismos.

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

Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula madre de tipo embrionario" se refiere a una célula que no deriva de la masa celular interna de un blastocisto. Según se utiliza en la presente memoria, una "célula madre de tipo embrionario" también puede ser referida como "célula madre de la placenta". Una célula madre de tipo embrionario, sin embargo, puede ser una célula pluripotente, una célula multipotente, o una célula progenitora comprometida. De acuerdo con los métodos de la invención, las células madre de tipo embrionario derivadas de la placenta se pueden recoger a partir de la placenta aislada una vez que se ha exanguinado y perfundido durante un período de tiempo suficiente para eliminar las células residuales.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "exanguinado" o "exanguinación," cuando se utiliza con respecto a la placenta, se refiere a la eliminación y/o drenaje de sustancialmente toda la sangre del cordón de la placenta. De acuerdo con la presente invención, la exanguinación de la placenta se puede lograr, por ejemplo, pero no a modo de limitación, mediante drenaje, flujo de salida inducido por gravedad, masaje, compresión, bombeo, etc. La exanguinación de la placenta se puede lograr adicionalmente mediante perfusión, aclarado o lavado de la placenta con un fluido que puede contener o no agentes, tales como anticoagulantes, para ayudar a la exanguinación de la placenta.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "perfundir" o "perfusión" se refiere al acto de verter o hacer pasar un fluido sobre o a través de un órgano o tejido, preferiblemente el paso de fluido a través de un órgano o tejido con la fuerza o presión suficientes para eliminar cualquier célula residual, p. ej., células no ancladas procedentes del órgano o tejido. Según se utiliza en la presente memoria, el término "perfusato" se refiere al fluido recogido después de su paso a través de un órgano o tejido.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula exógena" se refiere a una célula "foránea", es decir, una célula heteróloga (es decir, una célula "no propia" derivada de una fuente que no sea el donante de la placenta) o una célula autólogas (es decir, una célula "propia" derivada del donante de la placenta) que deriva de un órgano o tejido distinto de la placenta.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "organoide" se refiere a una agregación de uno o más tipos de células reunidas en el aspecto superficial o en estructura real como cualquier órgano o glándula de un organismo de mamífero, preferiblemente el cuerpo humano.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula multipotente" se refiere a una célula que tiene la capacidad de crecer en cualquier subconjunto de los aproximadamente 260 tipos de células del organismo de un mamífero. A diferencia de una célula pluripotente, una célula multipotente no tiene la capacidad de formar todos los tipos celulares.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula pluripotente" se refiere a una célula que tiene una versatilidad de diferenciación completa, es decir, la capacidad de crecer en cualquiera de los aproximadamente 260 tipos de células del organismo de un mamífero. Una célula pluripotente puede ser auto-renovable, y puede permanecer latente o quiescente dentro de un tejido. A diferencia de una célula totipotente (por ejemplo, un óvulo fertilizado diploide), una célula madre embrionaria no puede formar normalmente un nuevo blastocisto.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula progenitora" se refiere a una célula que está destinada a diferenciarse en un tipo específico de célula o a formar un tipo específico de tejido.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula madre" se refiere a una célula maestra que puede reproducirse indefinidamente para formar las células especializadas de los tejidos y órganos. Una célula madre es una célula evolutivamente pluripotente o multipotente. Una célula madre se puede dividir para producir dos células madre hijas, o una célula madre hija y una célula progenitora ("transitoria"), que a continuación prolifera en las células del tejido maduro, totalmente formadas.

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

I. Matrices de tejido

Matrices de tejido descelularizadas

Una matriz de tejido xenogénico (o alogénico) se procesa para eliminar las células nativas y otros antígenos y restos celulares de la matriz de tejido descelularizada, y, opcionalmente, se trata para inhibir la generación de nuevos sitios inmunológicos. Opcionalmente, esta matriz de tejido se puede tratar a continuación con los factores de adherencia celular que se describen a continuación para mejorar la unión de las células a la matriz durante el proceso de repoblación de la matriz de tejido con tales células nuevas. Se pueden obtener diferentes propiedades de la matriz resultante a través de la selección de tipos de células utilizadas para la repoblación de las matrices de tejido naturales, tales como la capacidad de sintetizar proteínas de otro modo atípica para el tejido natural en el sitio de implantación o única para ciertos grupos de edad. Estos injertos híbridos combinan las ventajas estructurales de injertos bioprotésicos con las capacidades funcionales y de regeneración de los aloinjertos, así como muestran una respuesta inmunitaria atenuada o nula, una propensión limitada a la calcificación, y una pequeña estimulación de tromboembolia.

Dependiendo del tipo de trasplante propuesto, si el destinatario es humano, el tejido u órgano de trasplante inicial puede ser de origen no humano. Estos tejidos u órganos se pueden obtener en mataderos autorizados de animales aptos para el consumo humano o de rebaños de animales domésticos mantenidos con el fin de proporcionar estos tejidos u órganos. Los tejidos u órganos se manipulan de una manera estéril, y cualquier disección adicional del tejido u órgano se lleva a cabo bajo condiciones asépticas.

Después de la recogida y la disección, este tejido puede ser esterilizado mediante la incubación en una solución de nutrientes tamponada estéril que contiene agentes antimicrobianos, por ejemplo, un antibacteriano, un antifúngico, o un esterilizante compatible con el trasplante de tejidos. El tejido de trasplante esterilizado puede ser crioconservado a continuación para su procesamiento adicional en un momento posterior o puede ser procesado adicionalmente de manera inmediata de acuerdo con las siguientes etapas de este proceso que incluyen una crioconservación posterior de la matriz de tejido u otros productos tisulares del proceso.

En primer lugar el tejido se descelulariza. Se eliminan las células viables nativas, así como otras estructuras o componentes celulares y acelulares que pueden provocar una respuesta inmunitaria adversa en el receptor del implante. Se conocen varios medios de reducción de la viabilidad de las células nativas en tejidos y órganos, incluyendo métodos físicos, químicos, y bioquímicos. Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.192.312 (Orton). Tales métodos pueden ser empleados de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento. Sin embargo, la técnica de descelularización empleada no debe dar como resultado la desorganización grosera de la anatomía del trasplante de tejidos o alterar sustancialmente las propiedades biomecánicas de sus elementos estructurales. El tratamiento del tejido para producir una matriz de tejido descelularizada tampoco debe dejar un entorno de citotóxico que mitigue la posterior repoblación de la matriz con células que son alogénicas o autólogas para el receptor. Las células y los tejidos que son alogénicos para el receptor son aquellas que se originan con o se derivan de un donante de la misma especie que el receptor. Las células o tejidos autólogos son aquellos que se originan con o derivan del receptor.

Se pueden utilizar fuerzas físicas, por ejemplo la formación de hielo intracelular, para descelularizar tejidos para trasplante. Por ejemplo, la congelación de la fase de vapor (baja tasa de disminución de la temperatura) de las válvulas cardíacas intactas puede reducir la celularidad de las valvas de la válvula cardiaca en comparación con la congelación de la fase líquida (rápida). Sin embargo, los procesos de congelación lenta, en ausencia de crioprotector, pueden dar como resultado una desorganización del tejido tal como la rotura de los conductos de las válvulas cardíacas. Se pueden añadir materiales formadores de coloides durante los ciclos de congelación-descongelación para alterar los patrones de formación de hielo en el tejido. Se puede añadir polivinilpirrolidona (10% p/v) e hidroxietilalmidón sometido a diálisis (10% p/v) a las disoluciones de crioconservación convencionales (DMEM, DMSO al 10%, suero bovino fetal al 10%) para reducir la formación de hielo extracelular permitiendo al mismo tiempo la formación de hielo intracelular. Esto permite una medición de la descelularización mientras que proporciona a la matriz de tejido cierta e protección frente al daño por el hielo.

Alternativamente, se pueden utilizar diversos tratamientos enzimáticos o químicos de otro tipo para eliminar las células nativas viables a partir de tejidos u órganos de implantes. Por ejemplo, la exposición prolongada de las

células a proteasas tales como la tripsina dan como resultado la muerte celular. Sin embargo, debido a que al menos una porción de la molécula de colágeno de tipo I es sensible a una variedad de proteasas, incluyendo la tripsina, éste no puede ser el enfoque de elección para injertos de colágeno destinados al implante en lugares de alto estrés mecánico.

Las combinaciones de diferentes clases de detergentes, p. ej., un detergente no iónico, Triton X-100, y un detergente aniónico, dodecilsulfato de sodio, pueden romper las membranas celulares y ayudar a la eliminación de restos celulares del tejido. Sin embargo, se deben tomar medidas para eliminar cualquier nivel de detergentes residuales en la matriz de tejido, con el fin de evitar la interferencia con la repoblación posterior de la matriz de tejido con células viables.

La descelularización del tejido de trasplante se realiza preferiblemente mediante la administración de una disolución eficaz para lisar las células nativas en el tejido de trasplante. Preferiblemente, la disolución es una disolución hipotónica acuosa o de fuerza iónica baja formulada para lisar eficazmente las células de los tejidos nativos. Tal disolución hipotónica acuosa puede ser agua desionizada o un tampón hipotónico acuoso. Preferiblemente, el tampón hipotónico acuoso puede contener aditivos que proporcionan condiciones sub-óptimas para la actividad de las proteasas seleccionadas, por ejemplo colagenasa, que puede ser liberada como resultado de la lisis celular. Aditivos tales como los quelantes de iones metálicos, por ejemplo, 1,10-fenantrolina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), crean un ambiente desfavorable para muchas enzimas proteolíticas. Proporcionar condiciones sub-óptimas para proteasas tales como la colagenasa, puede ayudar a la protección de la matriz de tejido de la degradación durante la etapa de lisis. Se pueden lograr condiciones subóptimas para las proteasas mediante la formulación de la disolución de lisis hipotónica para eliminar o limitar la cantidad de iones de calcio y zinc disponibles en la disolución. Muchas proteasas son activas en presencia de iones de calcio y de zinc y pierden gran parte de su actividad en entornos libres de iones de calcio y de zinc. Preferiblemente, la disolución de lisis hipotónica se preparará seleccionando las condiciones de pH, la reducción de la disponibilidad de iones de calcio y de zinc, la presencia de quelantes de iones metálicos y el uso de inhibidores proteolíticos específico para la colagenasa de manera que la disolución lise de manera óptima las células nativas a la vez que protege la matriz de tejido subyacente de la degradación proteolítica adversa. Por ejemplo una disolución de lisis hipotónica puede incluir una disolución de agua tamponada, pH 5,5 a 8, preferiblemente de pH 7 a 8, libre de iones de calcio y de zinc y que incluya un quelante de iones metálicos tal como EDTA. Adicionalmente, también se puede emplear el control de los parámetros de temperatura y tiempo durante el tratamiento de la matriz de tejido con la disolución de lisis hipotónica, para limitar la actividad de las proteasas.

Se prefiere que el tratamiento de descelularización de la matriz de tejido también limite la generación de nuevos sitios inmunológicos. Si bien el colágeno es típicamente sustancialmente no inmunogénico, la degradación enzimática parcial de colágeno puede conducir a un aumento de la inmunogenicidad. Por consiguiente, una etapa preferible de este proceso incluye el tratamiento del tejido con enzimas, tales como nucleasas, eficaces para inhibir el metabolismo celular, la producción de proteínas y la división celular sin degradar la matriz de colágeno subyacente. Las nucleasas que se pueden utilizar para la digestión del ADN y ARN de la célula nativa incluyen tanto exonucleasas como endonucleasas. Una amplia variedad de las cuales es adecuada para uso en esta etapa del procedimiento y está disponible comercialmente. Por ejemplo, las exonucleasas que inhiben eficazmente la actividad celular incluyen ADNasa I (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) y ARNasa A (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) y las endonucleasas que inhiben eficazmente la actividad celular incluyen EcoR I (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO) y Hind III (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).

Es preferible que las nucleasas seleccionadas sean aplicadas en una disolución de tampón fisiológico que contenga iones que sean óptimos para la actividad de la nucleasa. Tales iones incluyen sales de magnesio y calcio. También se prefiere que la concentración iónica de la disolución tamponada, la temperatura de tratamiento y la duración del tratamiento se seleccionen para asegurar el nivel deseado de actividad nucleasa eficaz. El tampón es preferiblemente hipotónico para promover el acceso de las nucleasas al interior de las células del pavimento. Para el tratamiento de las células endoteliales endógenas del tejido de las válvulas cardíacas no humanas, concretamente las válvulas de origen porcino o bovino, el tejido se trata preferiblemente con un medio tamponado fisiológicamente compuesto por las nucleasas ADNasa I y ARNasa A. Preferiblemente, la disolución de degradación de nucleasa contiene aproximadamente de 0,1 microgramos/ml a 50 microgramos/ml, preferiblemente 10 microgramos/ml, de la nucleasa ADNasa I, y de 0,1 microgramos/ml a 10 microgramos/ml, preferiblemente 1,0 microgramos/ml, de ARNasa A. El tejido puede ser descelularizado por medio de la aplicación de lo anterior a una temperatura de aproximadamente 20°C a 38°C, preferiblemente a aproximadamente 37°C (Centígrados), durante aproximadamente 30 minutos a 6 horas, mientras que al mismo tiempo la generación de nuevos sitios inmunológicos como resultado de la degradación del colágeno es limitada.

Otras digestiones enzimáticas pueden ser adecuadas para su uso en la presente memoria, por ejemplo, se pueden utilizar enzimas que interrumpan la función de las células nativas en un tejido de trasplante. Por ejemplo, se puede utilizar fosfolipasa, particularmente fosfolipasas A o C, en una disolución tamponada, para inhibir la función celular rompiendo las membranas celulares de las células endógenas. Preferiblemente, la enzima empleada no debe tener un efecto perjudicial sobre las proteínas de la matriz de tejido. Las enzimas adecuadas para su uso también se pueden seleccionar con respecto a la inhibición de la integridad celular, y también incluyen enzimas que pueden interferir en la producción de proteína celular. El pH del vehículo, así como la composición del vehículo, también se

ajustarán con respecto al perfil de actividad de pH de la enzima elegida para su uso. Por otra parte, la temperatura aplicada durante la aplicación de la enzima al tejido se debe ajustar con el fin de optimizar la actividad enzimática.

Después de la descelularización, la matriz de tejido se lava para garantizar la eliminación de los restos celulares que pueden incluir la proteína celular, los lípidos celulares, y ácido nucleico celular, así como cualquier resto extracelular tal como proteínas solubles, lípidos y proteoglicanos extracelulares. La eliminación de estos restos celulares y extracelulares reduce la probabilidad de que la matriz de tejido de trasplante provoque una respuesta inmunitaria adversa del receptor en el momento del implante. Por ejemplo, el tejido se puede incubar en una disolución salina equilibrada tal como Solución Salina Equilibrada de Hanks (HBSS). La composición del lavado con solución salina equilibrada, y las condiciones en que se aplica a la matriz de tejido de trasplante se pueden seleccionar para disminuir o eliminar la actividad de la nucleasa u otra enzima utilizada durante el proceso de descelularización. Tal disolución de lavado salina equilibrada no contendría preferiblemente sales de magnesio o de calcio, y el proceso de lavado puede incluir una incubación a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y 42°C, siendo lo más preferible 4°C. La matriz de tejido de trasplante se puede incubar en la disolución de lavado salina equilibrada durante un máximo de 10 a 12 días, con cambios en la disolución de lavado cada segundo o tercer día. Opcionalmente, se puede incluir un agente antibacteriano, un antifúngico o un esterilizante o una combinación de los mismos, en la disolución de lavado salina equilibrada para proteger la matriz de tejido de trasplante de la contaminación con patógenos ambientales.

La matriz de tejido se puede conservar mediante crioconservación. Los mecanismos de crioconservación de tejidos son bien conocidos en la técnica. Brockbank, K.G.M. Basic Principles of Viable Tissue Preservation. En: Transplantation Techniques and Use of Cryopreserved Allograft Caediac Valves and Vascular Tissue. D.R. Clarke (ed.), Adams Publishing Group, Ltd., Boston. págs. 9-23, comenta la crioconservación de tejidos y órganos.

La matriz de tejido, haya sido o no crioconservada, se puede tratar a continuación para mejorar la adherencia y la migración hacia el interior de las células alogénicas o autólogas, in vitro, que se utilizará para repoblar el tejido de trasplante.

El grado de anclaje se incrementa mediante la adición de suero (humano o bovino fetal, de unión máxima con suero al 1%) y de fibronectina purificada al medio de cultivo. Cada una de las dos subunidades homólogas de fibronectina tiene dos regiones de reconocimiento celular, la más importante de las cuales tiene la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD). Un segundo sitio, que se une a glicosaminoglicanos, actúa de forma sinérgica y parece estabilizar las interacciones célula-fibronectina mediadas por la secuencia RGD. El sulfato de heparina junto con el sulfato de condroitina son los dos glicosaminoglicanos identificados en las superficies celulares. El sulfato de heparina está ligado a las proteínas del núcleo (sindecano o hialuronectina) que pueden ser integrantes o abarcar la membrana. Los sitios de unión celular para las glicoproteínas de la matriz extracelular se denominan integrinas y éstas median la unión fuerte de las células a los factores de adherencia. Cada factor de adhesión parece tener una integrina especializada aunque una sola integrina puede unirse a varios factores de la matriz extracelular. Los fibroblastos, cuando se adhieren a una fibronectina intacta (dominios celulares y de unión a heparina) muestran una morfología contraída con adherencias focales. Sin el dominio de unión a la heparina, los fibroblastos se extenderán pero no lograrán desarrollar adherencias focales.

Otro método por medio del cual se mejora el anclaje de la célula a la matriz es mediante incubación de la matriz de tejido descelularizada en una disolución nutriente que contiene proteínas de la matriz extracelular, tales como fibronectina y un glicosaminoglicano durante un período eficaz para la unión de la fibronectina a las superficies de la matriz de tejido de trasplante que se va a repoblar. Los tampones preferidos para su uso con fibronectina/glicosaminoglicano incluyen fosfato de sodio/glicerina/albúmina de suero bovino (Suero Bovino Fetal, BIO Whittaker) y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), (Gibco). Estos tampones se utilizan típicamente para proporcionar un pH fisiológicamente aceptable de aproximadamente 7,0 a 7,6. La presencia de las proteínas de la matriz extracelular establece una superficie sobre la matriz de tejido a la que se adhieren las células que han sido elegidas para repoblar la matriz. El estímulo de la proteína de la matriz extracelular promueve la repoblación de células en el injerto. Una fuente de fibronectina es a partir de sangre humana, procesada para limitar la contaminación con virus. El glicosaminoglicano preferido es la heparina. La concentración de glicoproteína utilizada como factor de adherencia para el tratamiento de la matriz de tejido puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 microgramos/ml, prefiriéndose una concentración de fibronectina de 10 microgramos/ml. La razón en peso preferida de fibronectina a heparina es de aproximadamente 10 partes de fibronectina a aproximadamente 1 parte de glicosaminoglicano, p. ej., heparina. Esto es óptimo para la repoblación de valvas de la válvula cardíaca porcina, pero puede variar de aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 10:0,1 dependiendo del tejido utilizado.

Se puede emplear una variedad de sustancias para mejorar la quimiotaxis celular, aumentando la tasa de movimiento direccional a lo largo de un gradiente de concentración de la sustancia en disolución. Con respecto a las células fibroblásticas, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento transformante beta, y las moléculas de adherencia al sustrato, los colágenos fibrilares, los fragmentos de colágeno, y la fibronectina son quimiotácticos para los fibroblastos. En contraste con la adherencia celular, la migración de fibroblastos requiere la síntesis de proteína de novo; la síntesis de proteínas en células

fibroblásticas normales es estimulada por la adherencia de las células a la fibronectina, por lo que se cree que los procesos de adherencia celular y migración celular durante la repoblación están relacionados entre sí.

Matrices de tejido sintéticas

Las matrices de tejido también se pueden formar de materiales sintéticos o naturales, tales como colágeno o polilactida-co-glicolido. Se conocen varios de estos materiales. Por ejemplo, un método para la formación de piel artificial mediante la siembra de una red fibrosa con células epidérmicas se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.485.097 (Bell), que describe una red de colágeno hidratada que, combinada con agentes contráctiles tales como plaquetas y fibroblastos y células tales como queratinocitos, se utiliza para producir una sustancia similar a la piel. La Patente de los Estados Unidos Núm. 4.060.081 (Yannas et al.) describe una membrana de múltiples capas para su uso como piel sintética que se forma a partir de un material de colágeno modificado insoluble que es degradable muy lentamente en presencia de fluidos corporales y enzimas. La Patente de los Estados Unidos Núm. 4.458.678 (Yannas et al.) describe un procedimiento para la fabricación de un material similar a la piel en el que una red fibrosa biodegradable formada a partir de colágeno entrecruzado con glucosaminoglucano se siembra con células epidérmicas.

La Patente de los Estados Unidos Núm. 4.520.821 (Schmidt) describe un enfoque similar para elaborar revestimiento para reparar defectos en el tracto urinario. Las células epiteliales se implantan sobre la superficie de una matriz polimérica sintética impermeable a los líquidos donde forman un revestimiento monocapa sobre la matriz.

Vacanti, et al., "Selective Cell Trasplantation Using Bioabsorbable Artificial Polymers as Matrices", J. Pediat. Surg. 23, 3-9 (1988) y Vacanti, "Beyond Trasplantation" Arch. Surg. 123, 545-549 (1988), describen un enfoque para la fabricación de nuevos órganos para el trasplante. Vacanti, et al., reconocieron que las células requieren una matriz para el anclaje y soporte si han de sobrevivir después de la implantación, que era esencial un número mínimo de células para la función *in vivo*, y que la matriz debe ser suficientemente porosa para permitir que los nutrientes y gases alcancen todas las células sobre y dentro de la matriz por difusión, hasta que la estructura de células de la matriz se vascularice. Informan de que existen ventajas en la utilización de sustratos de polímeros sintéticos biodegradables para formar un armazón que imita sus contrapartes naturales, las matrices extracelulares (MEC) del organismo, que sirven como soporte físico y como sustrato adherente para las células parenquimatosas aisladas durante el cultivo *in vitro*, y la posterior implantación, degradándose a medida que las células comienzan a secretar su propio soporte MEC. Estas matrices también se han implantado y sembrado directamente, para formar nuevos tejidos.

II. Células que se sembraron sobre/dentro de los tejidos descelularizados

Las células madre humanas son células precursoras totipotenciales o pluripotenciales capaces de generar una variedad de linajes celulares humanos maduros. Esta capacidad sirve como base para la diferenciación y la especialización celulares necesarias para el desarrollo de órganos y tejidos. El reciente éxito en el trasplante de estas células madre ha proporcionado nuevas herramientas clínicas para reconstituir y/o complementar la médula ósea después mieloablación debida a la enfermedad, exposición a agentes químicos tóxicos o radiación. Existe una evidencia adicional que demuestra que las células madre se pueden emplear para repoblar muchos, si no todos, los tejidos y restaurar su funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de células madre a la ingeniería de tejidos, la administración de terapia génica y la terapia celular también está avanzando rápidamente.

La obtención de suficientes células madre humanas ha sido problemática por varias razones. En primer lugar, el aislamiento de las poblaciones de células madre de origen natural en tejidos adultos ha resultado técnicamente difícil, costoso y muy limitado en cantidad. En segundo lugar, la adquisición de estas células a partir de embriones o de tejido fetal incluyendo abortos ha planteado muchas preocupaciones éticas y morales. La creencia generalizada de que el embrión y el feto humanos constituyen una vida independiente ha justificado una moratoria en el uso de tales fuentes para cualquier propósito. Las fuentes alternativas que no violan la inviolabilidad de la vida independiente son fundamentales para seguir avanzando en el uso de células madre clínicamente.

La sangre de cordón umbilical (sangre de cordón) es una fuente conocida de células madre progenitoras pluripotentes hematopoyéticas, que son crioconservados para su uso en la reconstitución hematopoyética. El uso de sangre de cordón para este propósito es bien conocido y se está convirtiendo en un procedimiento terapéutico ampliamente utilizado. La técnica convencional para la recolección de la sangre de cordón se basa en el uso de una aguja o cánula que se utiliza con la ayuda de la gravedad para drenar la sangre del cordón umbilical de la placenta. Por lo general, la aguja o cánula se coloca en la vena umbilical y la placenta se masajea suavemente para ayudar al drenaje de la sangre del cordón procedente de la placenta.

El solicitante ha descubierto de forma inesperada que la placenta después del nacimiento contiene células quiescentes que se pueden activar si la placenta se procesa apropiadamente después del nacimiento. Por ejemplo, después de la expulsión del útero, la placenta se exanguina lo más rápidamente posible para evitar o reducir al mínimo la apoptosis. Posteriormente, tan pronto como sea posible después de la exanguinación la placenta se perfunde para eliminar la sangre, las células residuales, las proteínas, los factores y cualquier otro material presentes en el órgano. La perfusión continúa normalmente con producto de perfusión adecuado durante al menos

dos a más de veinticuatro horas. En varias realizaciones adicionales la placenta se somete a perfusión durante al menos 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, y 22 horas. En otras palabras, esta invención se basa al menos en parte en el descubrimiento de que las células de la placenta después del parto se pueden activar por exanguinación y la perfusión durante un período de tiempo suficiente. Por lo tanto, la placenta se puede utilizar fácilmente como fuente rica y abundante de células madre placentarias humanas, cuyas células se pueden utilizar para la investigación, incluyendo el descubrimiento de fármacos, el tratamiento y la prevención de enfermedades, en particular cirugías o terapias de trasplante, y en la generación de células, tejidos y organoides comprometidos.

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

Se describen aquí métodos de tratamiento y cultivo de una placenta aislada para su uso como biorreactor para la producción y propagación de células madre de tipo embrionario que se originan a partir de la placenta o de fuentes exógenas. Además, se describe aquí el uso de una placenta cultivada como biorreactor para producir materiales biológicos, incluyendo, pero no limitados a, anticuerpos, hormonas, citocinas, y factores de crecimiento. También se describen aquí métodos de recolección y aislamiento de células madre y materiales biológicos procedentes de la placenta cultivada.

El método de la presente invención implica perfundir y exanguinar de una placenta aislada una vez que ésta ha sido eliminada del útero, para eliminar todas las células residuales. También se describe aquí el cultivo de la placenta aislada y exanguinada en las condiciones adecuadas para permitir la producción y propagación de células madre de tipo embrionarios.

El método de la presente invención implica extraer y recuperar células madre de tipo embrionario incluyendo, pero no limitadas a células madre pluripotentes o multipotentes, de una placenta humana exanguinada. Las células madre de tipo embrionario tienen las características de las células madre embrionarias, pero derivan del embrión. Tales células son tan versátiles (p. ej., pluripotentes) como las células madre embrionarias humanas. De acuerdo con los métodos de la invención, la placenta humana se utiliza después del nacimiento como fuente de células madre de tipo embrionario.

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

Métodos de aislamiento y cultivo de placenta

A continuación se describe, entre otras cosas, el método de recolección de las células madre de la placenta y otras células madre multipotentes a partir de una placenta. El presente solicitante describe este método en detalle en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos pendiente del solicitante con el Núm. de Serie 10/004.942, presentada el 5 de Diciembre de 2001, que reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Núm. 60/251.900, presentada el 6 de Diciembre de 2000, y referida a la solicitud de patente estadounidense pendiente con el número de serie 10/004.942 que se hace referencia en esta solicitud.

Pretratamiento de la placenta

De acuerdo con los métodos de la invención, una placenta (por ejemplo, una placenta humana) se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento y, en ciertos aspectos descritos aquí, se recupera la sangre del cordón en la placenta. En ciertos aspectos descritos aquí, la placenta se somete a un proceso de recuperación de sangre de cordón convencional. Dicha recuperación de sangre de cordón se puede obtener comercialmente, tal como por ejemplo Lifebank Services, Bethesda, MD. La sangre del cordón puede ser drenada poco después de la expulsión de la placenta. Alternativamente, la placenta se puede almacenar, preferiblemente durante no más de 48 horas, antes de la recogida de sangre del cordón.

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

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

Se pueden utilizar técnicas convencionales para la recogida de sangre del cordón. Típicamente se utiliza una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para drenar la sangre del cordón desde (*es decir,* exanguinar) la placenta (Boyse et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.192.553, expedida el 9 de Marzo de 1993; Anderson, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.372.581, titulada Método y aparato para la recogida de sangre placentaria, expedida el 13 de diciembre 1994; Hessel et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.415.665, titulada Dispositivo y método de pinzamiento, corte, y recolección de sangre del cordón umbilical, expedida el 16 de Mayo de 1995). La aguja o cánula se colocan generalmente en la vena umbilical y la placenta se masajea suavemente para ayudar al drenaje de sangre del cordón procedente de la placenta.

Típicamente, la placenta se transporta desde la sala de partos o nacimientos a otra ubicación, p. ej., un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y/o el drenaje y perfusión. 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 pinzado, en una bolsa de plástico con cierre de cremallera estéril, que después se coloca en un recipiente aislado, como se muestra en las Figuras 2a-e.

En una realización preferida, la placenta se recupera de un paciente mediante consentimiento informado y también se toma la historia médica completa del paciente antes, durante y después del embarazo y se asocia con la placenta. Estos registros médicos se pueden utilizar para coordinar el uso subsiguiente de la placenta o de las células madre obtenidas de la misma. Por ejemplo, las células madre placentarias humanas se puede utilizar a continuación fácilmente para la medicina personalizada para el niño en cuestión, los padres, hermanos u otros parientes. De hecho, las células madre placentarias humanas son más versátiles que la sangre del cordón. Sin embargo, hay que observar que la invención incluye la adición de las células madre placentarias humanas producidas por la placenta exanguinada, perfundida y/o cultivada a sangre de cordón de la misma o diferente placenta y cordón umbilical. La sangre del cordón resultante tendrá un aumento de concentración/población de células madre humanas y por lo tanto es más útil para el trasplante p. ej., en los trasplantes de médula ósea.

Exanguinación de la placenta y eliminación de células residuales

La invención incluye la recuperación de las células madre o progenitoras, que incluyen, pero no están limitadas a células madre de tipo embrionario, de una placenta que es exanguinada, esto es, completamente drenada de la sangre del cordón restante después del nacimiento y/o un procedimiento de recuperación de sangre de cordón convencional. De acuerdo con los métodos de la invención, la placenta se exanguina y perfunde con un fluido de perfusión acuoso adecuado, tal como un fluido isotónico acuoso en el que se disuelve un anticoagulante (p. ej., heparina, warfarina sódica). Tales fluidos isotónicos acuosos para la perfusión son bien conocidos en la técnica, e incluyen, p. ej., una solución de cloruro de sodio 0,9 N. El fluido de perfusión comprende preferiblemente el anticoagulante, tal como heparina o warfarina sádica, a una concentración que sea suficiente para prevenir la formación de coágulos de cualquier sangre del cordón residual. En una realización específica, se emplea una concentración de 100 a 1000 unidades de heparina. En una realización, se pueden utilizar inhibidores de la apoptosis durante e inmediatamente después de la exanguinación y a continuación estos agentes se pueden lavar de la placenta.

De acuerdo con los métodos de la invención, la placenta se exanguina haciendo pasar fluido de perfusión a través de una o ambas de la arteria umbilical y la vena umbilical, utilizando un flujo de gravedad en la placenta. La placenta se orienta preferiblemente (p. ej. suspende) en tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical se encuentren en el punto más alto de la placenta. En una realización preferida, la arteria umbilical y la vena umbilical se conectan de forma simultánea, como se muestra en la Figura 1, a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un depósito del fluido de perfusión. El fluido de perfusión se hace pasar a la vena y la arteria umbilicales y se recoge en un recipiente abierto adecuado de la superficie de la placenta que se adosa al útero de la madre durante la gestación.

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

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

Se ha observado que cuando el fluido de perfusión se recoge primero de una placenta durante el proceso de exanguinación, el fluido se colorea con los glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón. El líquido de perfusión tiende a aclararse a medida que avanza de perfusión y las células de la sangre de cordón residuales se lavan de la

placenta. Generalmente son adecuados de 30 a 100 ml (mililitros) de fluido de perfusión para exanguinar la placenta y para recuperar una población inicial de células de tipo embrionario de la placenta, pero se puede utilizar más o menos fluido de perfusión en función de los resultados observados.

Cultivo de placenta

Después de la exanguinación y la perfusión de la placenta, se observa que las células madre de tipo embrionario migran a la microcirculación exanguinada y perfundida de la placenta, donde de acuerdo con los métodos de la invención, se recogen, preferiblemente mediante lavado en un recipiente de recolección mediante perfusión. La perfusión de la placenta aislada no solo sirve para eliminar la sangre residual del cordón sino que también proporciona a la placenta los nutrientes apropiados, incluyendo oxígeno.

La placenta exanguinada drenada se puede cultivar como un biorreactor, es decir, un sistema *ex vivo* para la propagación de las células o la producción de materiales biológicos. El número de células propagadas o el nivel de material biológico producido en el biorreactor de placentario se mantienen en un estado continuo de crecimiento equilibrado mediante la eliminación periódica o continua de una porción del medio de cultivo o del fluido de perfusión que se introducen en el biorreactor placentario, y a partir de los cuales se pueden recuperar las células propagadas o los materiales biológicos producidos. El medio de nueva aportación o el fluido de perfusión se introducen a la misma velocidad o en la misma cantidad.

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

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

En otra realización, se pueden utilizar cuentas magnéticas para separar las células. Las células se pueden clasificar utilizando una técnica de clasificación celular activada magnéticamente (MACS), un método para la separación de partículas basado en su capacidad para unirse a cuentas magnéticas (diámetro 0,5-100 µm). 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 la superficie en fase sólida de la célula o hapteno. A continuación se aplica un campo magnético, para manipular físicamente las cuentas seleccionadas. Después se mezclan las cuentas con las células para permitir la unión. Las células se hacen pasar a continuación a través de un campo magnético para separar las células que tienen marcadores de la superficie celular. Estas células se pueden aislar después y volver a mezclar con cuentas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra otros marcadores de superficie celular. Las células se hacen pasan de nuevo a través de un campo magnético, aislando las células que se han unido a ambos anticuerpos. Tales células se pueden diluir a continuación en placas separadas, tales como placas de microtitulación para el aislamiento clonal.

En realizaciones preferidas, la placenta que se va a utilizar como biorreactor es exanguinada y lavada en condiciones estériles de manera que se elimina cualquiera de los contaminantes celulares coagulados adherentes y no adherentes. La placenta se desarrolla o se cultiva a continuación en condiciones asépticas en un contenedor u otro recipiente adecuado, y se perfunde con una solución de perfusato (p. ej., una solución salina normal, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS)) con o sin un anticoagulante (p. ej., tal como por ejemplo, heparina o warfarina sodica), y/o con o sin un agente antimicrobiano (p. ej., tal como un antibiótico).

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

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

En una realización, se coloca una placenta en un recipiente estéril y se lava con 500 ml de solución salina normal tamponada con fosfato. El fluido de lavado se desecha a continuación. Después se canula la vena umbilical con una cánula, p. ej., una cánula de TEFLON7 o plástico, que se conecta a un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un manguito de perfusión, como se muestra en la Figura 3. El contenedor que contiene la placenta se cubre a continuación y la placenta se mantiene a la temperatura ambiente (20-25 grados C) durante un período de tiempo deseado, preferiblemente de 2 a 24 horas, y preferiblemente, no más de 48 horas. La placenta puede ser perfundida continuamente, con volúmenes iguales de perfusato introducido y perfusato efluente eliminado o recogido. Alternativamente, la placenta se puede perfundir periódicamente, p. ej., a cada 2 horas o a las 4, 8, 12, y 24 horas, con un volumen de perfusato, p. ej., preferentemente, 100 ml de perfusato (solución salina normal estéril con un suplemento con o sin 1.000 U/l de heparina y/o EDTA y/o CPDA (fosfato de creatina-dextrosa)). En el caso de la perfusión periódica, se introducen preferiblemente volúmenes iguales de perfusato y se eliminan del entorno de cultivo de la placenta, de manera que un volumen estable de perfusato baña la placenta en todo momento.

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

Se pueden utilizar varios medios como fluido de perfusión para el desarrollo o el cultivo de la placenta, tal como DMEM, F-12, M199, RPMI, de Fisher, de Iscore, de McCoy y combinaciones de los mismos, con un suplemento de suero fetal bovino (FBS), suero humano completo (WHS), o suero de cordón umbilical humano recogido en el momento de la expulsión de la placenta.

En ciertas realizaciones, se induce la propagación de las células madre de tipo embrionario mediante la introducción de nutrientes, hormonas, vitaminas, factores de crecimiento, o cualquier combinación de los mismos, en la solución de perfusión. Se pueden añadir suero y otros factores de crecimiento a la solución de perfusión o medio de propagación. Los factores de crecimiento son generalmente proteínas e incluyen por ejemplo, pero no se limitan a: citocinas, linfoquinas, interferones, factores estimuladores de colonias (CSF), interferones, quimiocinas, e interleucinas. Otros factores de crecimiento que se pueden utilizar incluyen factores de crecimiento hematopoyéticos humanos recombinantes, que incluyendo, por ejemplo, ligandos, factores de células madre, trombopoyetina (TPO), interleucinas, y factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF).

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

En un aspecto de la descripción, la placenta se utiliza como un biorreactor para la propagación de células endógenas (es decir, células que se originan a partir de la placenta), incluyendo pero no limitadas a, varios tipos de células madre de tipo embrionario pluripotentes y/o totipotentes y linfocitos. Para utilizar la placenta como biorreactor, ésta se puede cultivar durante períodos de tiempo variables en condiciones estériles mediante perfusión con solución de perfusato como se describe en la presente memoria. En realizaciones específicas, la placenta se cultiva durante al menos 12, 24, 36, ó 48 horas, o durante 3-5 días, 6-10 días, o durante una a dos semanas. En una realización preferida, la placenta se cultiva durante 48 horas. La placenta cultivada debe ser "alimentada" periódicamente para eliminar el medio gastado, despoblar las células liberadas, y añadir medio de nueva aportación. La placenta cultivada se debe almacenar en condiciones estériles para reducir la posibilidad de contaminación, y mantenerla bajo presurización intermitente y periódica para crear condiciones que mantengan un suministro adecuado de nutrientes a las células de la placenta. Se debe reconocer que la perfusión y el cultivo de la placenta pueden ser ambos automatizados e informatizados para la eficiencia y el aumento de la capacidad.

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

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

Los métodos para la destrucción selectiva, la ablación o la eliminación de células en proliferación o división rápida de un tejido u órgano son bien conocidos en la técnica, p. ej., métodos de tratamiento de cánceres o tumores. Por ejemplo, la placenta perfundida puede ser irradiada con radiación electromagnética, ultravioleta, rayos X, gamma- o beta- para erradicar todas las células endógenas, viables restantes. Las células foráneas que se van a propagar se introducen en el biorreactor placentario irradiado, p. ej., mediante perfusión.

Recolección de células de la placenta

Como se ha descrito anteriormente, después de la exanguinación y la perfusión de la placenta, las células madre de tipo embrionario migran a la microcirculación drenada, vacía donde son recogidas, preferiblemente recogiendo el perfusato efluente en un recipiente de recolección.

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

En una realización específica, las células recogidas de la placenta se recuperan del perfusato efluente mediante centrifugación a X 00 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, lo que separa las células de los restos contaminantes y las plaquetas. Los sedimentos celulares se vuelven a suspender en medio IMDM libre de suero que contiene 2U/ml de heparina y EDTA 2 mM (Gibco BRL, NY). La fracción total de células mononucleares se aisló utilizando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante y la fracción de células mononucleares se volvió a suspender. Las células se contaron utilizando un hemocitómetro. La viabilidad se evaluó mediante exclusión con azul de trípano. El aislamiento de las células se consigue mediante "tripsinización diferencial", utilizando una solución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial fue posible porque las células fibroblastoides se separaron de las superficies de plástico en el plazo de aproximadamente cinco minutos, mientras que las otras poblaciones adherentes necesitaron más de 20-30 minutos de incubación. Las células fibroblastoides separadas se recogieron después de la tripsinización y la neutralización con tripsina, utilizando Solución Neutralizadora de Tripsina ("TNS en sus siglas en inglés", BioWhittaker). Las células se lavaron en H.DMEM y se volvieron a suspender en MSCGM.

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

En un aspecto descrito aquí, las células cultivadas en el biorreactor de placenta se aíslan de la placenta mediante la disección física de las células de la placenta.

En un aspecto descrito aquí, las células cultivadas en el biorreactor de placenta se aíslan de la placenta mediante disociación de los tejidos de la placenta o una porción del mismo, y recuperación de las células cultivadas mediante métodos de separación o clasificación celular conocidos en la técnica tales como centrifugación en gradiente de densidad, separación de células magnéticamente, citometría de flujo, etc.

En una realización preferida, la perfusión de la placenta y la recogida del perfusato efluente se repiten una o dos veces durante el cultivo de la placenta, hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfusatos se agrupan y se someten a centrifugación ligera para eliminar las plaquetas, los restos y las membranas celulares enucleadas. Las células nucleadas se aíslan a continuación mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque y después del lavado, se resuspenden en H.DMEM. Para el aislamiento de las células adherentes, se colocan alícuotas de 5-10 x 10^6 células en cada uno de varios matraces T-75 y se cultivan con Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM) disponible en el mercado obtenido de BioWhittaker, y se colocan en una incubadora de cultivo de tejidos (37°C, 5% de CO_2). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiran de los matraces mediante lavado con PBS. A continuación el PBS se remplaza por MSCGM. Los matraces se examinan preferiblemente de manera diaria para determinar la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y expansión de las agrupaciones de células fibroblastoides.

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

Poblaciones de células obtenidas de o cultivadas en placenta

Las células madre de tipo embrionario obtenidas de acuerdo con los métodos de la invención pueden incluir células pluripotentes, es decir, células que tienen una versatilidad de diferenciación completa, que son autorrenovables, y

pueden permanecer en estado latente o quiescentes en el tejido. Las células madre de tipo embrionario también pueden incluir células multipotentes, células progenitoras comprometidas, o células fibroblastoides.

En una realización preferida, las células madre de tipo embrionario obtenidas por medio de los métodos de la invención son células madre pluripotenciales, quiescentes, viables que existen dentro de una placenta humana a término y que se pueden recuperar después del nacimiento con éxito y la expulsión de la placenta, dando como resultado la recuperación de tantas como mil millones de células nucleadas, que producen 50-100 millones de células madre multipotentes y pluripotentes.

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

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

Las células madre de tipo embrionario preferidas obtenidas por medio de los métodos implicados en la invención pueden ser identificadas por la presencia de los siguientes marcadores de superficie celular: CD10+, CD29+, CD34-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+, y ABC-p+. Tales marcadores de superficie celular son determinados de forma rutinaria de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, p. ej. mediante citometría de flujo, seguida de lavado y tinción con un anticuerpo anti-marcador de superficie celular. Por ejemplo, para determinar la presencia de CD-34 o CD-38, las células se pueden lavar en PBS y después teñir doblemente con ficoeritrina anti-CD34 e isotiocianato de fluoresceína anti-CD38 (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Se puede inducir la diferenciación de las células madre de tipo embrionario obtenidas por medio de los métodos de la invención a lo largo de linajes celulares específicos, incluyendo adipogénico, condrogénico, osteogénico, hematopoyético, miogénico, vasogénico, neurogénico, y hepatogénico. En ciertas realizaciones, se induce la diferenciación de las células madre de tipo embrionario obtenidas de acuerdo con los métodos de la invención para su uso en el trasplante y en protocolos de tratamiento *ex vivo*.

En ciertas realizaciones, se induce la diferenciación de las células madre de tipo embrionario obtenidas mediante los métodos de la invención a un tipo celular concreto y se manipulan genéticamente para proporcionar un producto génico terapéutico. Las células madre de tipo embrionario obtenidas por medio de los métodos descritos aquí se pueden incubar con un compuesto *in vitro* que las induce a diferenciarse, seguido del trasplante directo de las células diferenciadas a un sujeto. De este modo, se describen aquí métodos de diferenciación de las células madre placentarias humanas utilizando medios de cultivo convencionales. Adicionalmente, la invención incluye células hematopoyéticas, células neuronales, células fibroblásticas, células en hebra, células mesenquimales y células hepáticas.

Las células madre de tipo embrionario también se pueden cultivar adicionalmente después de la recolección a partir de la placenta utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el cultivo sobre células alimentadoras, tales como fibroblastos irradiados, obtenidos a partir de la misma placenta que las células madre de tipo embrionario o de otras fuentes humanas o no humanas, o en medios acondicionados obtenidos a partir de cultivos de tales células alimentadoras, con el fin de obtener cultivos continuos a largo plazo de células madre de tipo embrionario. Las células madre de tipo embrionario también se pueden expandir, ya sea dentro de la placenta antes de la recolección desde el biorreactor placentario ya sea *in vitro* después de la recuperación de la placenta. Las células madre de tipo embrionario que se van a expandir se exponen a, o se cultivan en presencia de, un agente que suprime la diferenciación celular. Tales agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos Delta-1 humano y Serrate-1 humanos (véase, Sakano et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.337.387 titulada "Diferentiation-suppressive polypeptide", expedida el 8 de Enero de 2002), factor inhibidor de leucemia (LIF) y factor de células madre. Los métodos para la expansión de las poblaciones de células son también conocidos en la técnica (véanse, p. ej., Emerson et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.326.198 titulada "Methods and compositions for the ex vivo replication of stem cells, for the optimization of hematopoyetic progenitor cell cultures, and for increasing the metabolism, GM-CSF secretion and/or IL-6 secretion of human stromal cells", expedida el 4 de Diciembre de 2001; Kraus et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.338.942, titulada "Selective expansion of target cell populations", expedida el 15 de Enero de 2002).

Las células madre de tipo embrionario pueden ser evaluadas para determinar su viabilidad, su potencial de proliferación, y su longevidad utilizando mecanismos conocidas en la técnica, tales como el análisis de exclusión con azul de trípano, el análisis de absorción de diacetato de fluoresceína, el análisis de absorción de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y el análisis de absorción de timidina, el análisis de proliferación celular MTT (para

evaluar la proliferación). La longevidad se puede determinar por medio de métodos bien conocidos en la técnica, tales como la determinación del número máximo de duplicación de la población en un cultivo prolongado.

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

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

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

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

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

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

En otra realización, las células cultivadas en la placenta son estimuladas para proliferar, por ejemplo, mediante la administración de eritropoyetina, citoquinas, linfoquinas, interferones, factores estimuladores de colonias (CSF), interferones, quimiocinas, interleucinas, factores de crecimiento hematopoyéticos humanos recombinantes incluyendo ligandos, factores de células madre, trombopoyetina (TPO), interleucinas y factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) u otros factores de crecimiento.

En otra realización, las células cultivadas en la placenta se manipula genéticamente, o bien antes, o bien después de la recolección de la placenta, utilizando, por ejemplo, un vector viral tal como un vector adenoviral o retroviral, o mediante el uso de medios mecánicos tales como la absorción de ADN mediada por liposomas o mediada químicamente.

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

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

Para la transfección estable de células de mamífero en cultivo, tales como el cultivo de células en una placenta, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. La eficiencia de la integración depende del vector y de la técnica de transfección utilizados. Con el fin de identificar y seleccionar los integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (p. ej., para la resistencia a antibióticos) en la célula madre de tipo embrionario anfitriona, junto con la secuencia génica de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido se pueden identificar mediante selección con fármacos (p. ej., las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán). Tales métodos son particularmente útiles en los métodos que

implican la recombinación homóloga en células de mamífero (p. ej., en las células madre de tipo embrionario) antes de la introducción o el trasplante de las células recombinantes en un sujeto o paciente.

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

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

En una realización específica, se utilizan los métodos de Bonadio et al. (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.942.496, titulada Methods and compositions for multiple gene transfer into bone cells, expedida el 24 de Agosto de 1999 y PCT WO 95/22611, titulada "Methods and compositions for stimulating bone cells" publicada el 24 de Agosto de 1995) para introducir ácidos nucleicos en una célula de interés, tal como una célula madre o una célula progenitora cultivadas en la placenta, p. ej., células progenitoras óseas.

Usos de placenta cultivada como biorreactor

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

En un aspecto descrito aquí, la placenta puede estar poblada de cualquier tipo de célula concreto y utilizarse como biorreactor para el cultivo *ex vivo* de células, tejidos u órganos. Tales cultivos de células, tejidos u órganos se pueden cosechar y utilizar en trasplantes y protocolos de tratamiento *ex vivo*. En esta realización, la placenta se procesa para eliminar todas las células endógenas y para permitir la introducción y propagación de células foráneas (es decir, exógenas) en el entorno de la placenta perfundida. Los métodos para la eliminación de las células endógenas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la placenta perfundida se irradia con radiación electromagnética, ultravioleta, rayos X, beta o gamma para erradicar todas las células endógenos, viables restantes. Las células foráneas de interés que se van a propagar en el biorreactor placentario irradiado se introducen a continuación, p. ej., mediante la introducción de las células por medio de perfusión, a través de la vasculatura o mediante inyección directa en la placenta.

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

En otros aspectos descritos aquí, el biorreactor se puede utilizar para potenciar el crecimiento de un tipo de célula concreto, ya sea de origen nativo o sintético. En otros descritos aquí, se utiliza la placenta como biorreactor para la propagación de células endógenas (esto es, células que se originan a partir de la placenta), incluyendo pero no limitadas a, diferentes clases de células madre de tipo embrionario pluripotentes y/o totipotentes y linfocitos. En otro aspecto descrito aquí, la placenta se incuba durante períodos variables de tiempo con una solución de perfusato como se describe en la presente memoria. Tales células endógenas de origen placentario pueden ser transformadas para expresar recombinantemente un gen de interés, para expresar mutaciones, y/o pueden ser manipuladas para

suprimir un locus genético, utilizando la tecnología "knock out" (inactivación de genes). Por ejemplo, se puede suprimir un gen diana endógeno inactivando o "noqueando" el gen diana o su promotor utilizando recombinación homóloga dirigida (p. ej., véanse Smithies, et al., 1985, Nature 317, 230-234; Thomas y Capecchi, 1987, Cell 51, 503-512; Thompson, et al., 1989, Cell, 5, 313-321). Por ejemplo, se pueden utilizar un gen diana no funcional, mutante (o una secuencia de ADN no relacionada absoluto) flanqueado por ADN homólogo al gen diana endógeno (ya sea las regiones codificantes o las regiones reguladoras del gen diana), con o sin un marcador seleccionable y/o un marcador seleccionable negativo, para transfectar células que expresan el gen diana in vivo. La inserción del constructo de ADN, mediante recombinación homóloga dirigida, da como resultado la inactivación del gen diana. Estos enfoques pueden ser utilizados para eliminar, sustituir o alterar la expresión de genes de interés en células, tejidos y/u órganos. Este enfoque se puede utilizar para alterar el fenotipo de una célula, tejido, u órgano, que pueden ser introducidos a continuación en un sujeto humano.

En otras realizaciones, se puede inducir la diferenciación de una célula de la placenta a un tipo de célula particular, ya sea *ex vivo* o *in vivo.* Por ejemplo, se pueden inyectar células madre de tipo embrionario pluripotentes en un órgano dañado, y para la neogénesis de órganos y la reparación de la lesión *in vivo.* Dicha lesión puede ser debida a tales condiciones y trastornos, incluyendo, pero no limitados a, infarto de miocardio, trastorno convulsivo, esclerosis múltiple, derrame cerebral, hipotensión, paro cardíaco, isquemia, inflamación, pérdida de la función cognitiva relacionada con la edad, daño por radiación, parálisis cerebral, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia por SIDA, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad renal isquémica, trauma cerebral o de la médula espinal, bypass corazón-pulmón, glaucoma, isquemia retiniana, o trauma retiniano.

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

En otras realizaciones, las células se pueden utilizad como portadores de transgenes autólogos o heterólogos en la terapia génica para corregir errores innatos del metabolismo o para tratar el cáncer, tumores u otras afecciones patológicas.

En otras realizaciones, las células se pueden utilizar en las terapias o protocolos de regeneración o sustitución de tejido autólogo o heterólogo, incluyendo, pero no limitados al tratamiento de defectos epiteliales de la córnea, reparación de cartílago, dermoabrasión facial, membranas mucosas, membranas timpánicas, revestimientos intestinales, estructuras neurológicas (p. ej., retina, neuronas auditivas en la membrana basilar, neuronas olfativas en el epitelio olfativo), reparación de quemaduras y heridas por lesiones traumáticas de la piel, o para la reconstrucción de otros órganos o tejidos dañados o enfermos.

Las células madre de tipo embrionario, las células progenitoras, las células foráneas, o las células manipuladas obtenidas a partir de una placenta como se describe aquí se pueden utilizar en la fabricación de un tejido u órgano *in vivo.* Los métodos de la invención incluyen el uso de células obtenidas de la placenta, p. ej. células madre de tejido embrionario, células progenitoras, o células madre o progenitoras foráneas, para sembrar una matriz y ser cultivadas en las condiciones apropiadas para permitir la diferenciación de las células y el poblamiento de la matriz. Los tejidos y órganos obtenidos por medio de los métodos descritos aquí se pueden utilizar para una variedad de fines, incluyendo fines terapéuticos y de investigación.

Usos de células madre de tipo embrionario

Las células madre de tipo embrionario descritas aquí se pueden utilizar para una amplia variedad de protocolos terapéuticos en los que un tejido u órgano del cuerpo, es aumentado, reparado o sustituido mediante el injerto, el trasplante o la infusión de una población de células deseada, tal como una población de células madre o de células progenitoras. Las células madre de tipo embrionario se pueden utilizar para sustituir o aumentar tejidos existentes, para introducir tejidos nuevos o alterados, o para unir entre sí tejidos o estructuras biológicas.

Por ejemplo, las células madre de tipo embrionario se pueden utilizar en protocolos de transplante terapéuticos, p. ej., para aumentar o sustituir células madre o progenitoras de órganos o tejidos tales como hígado, páncreas, riñón, pulmón, sistema nervioso, sistema muscular, hueso, médula ósea, timo, bazo, tejido de la mucosa, gónadas, o pelo.

Las células madre de tipo embrionario se pueden utilizar en lugar de las clases específicas de células progenitoras (p. ej., condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células del parénquima pancreático, neuroblastos, células progenitoras musculares, etc.) en los protocolos terapéuticos o de investigación en los que se utilizarían típicamente células progenitoras.

Las células madre de tipo embrionario se pueden utilizar para el aumento, la reparación o la sustitución de cartílagos, tendones o ligamentos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las prótesis (p. ej., prótesis de cadera) están recubiertas con constructos de tejido de cartílago de sustitución desarrollados a partir de células madre de tipo embrionario. En otras realizaciones, se reconstruyen articulaciones (p. ej., rodilla) con constructos de tejido de

cartílago desarrollados a partir de células madre de tipo embrionario. Los constructos de tejido de cartílago también se pueden emplear en la cirugía reconstructiva mayor para diferentes tipos de articulaciones (para los protocolos, véanse, p. ej., Resnick, D., y Niwayama, G., eds., 1988, Diagnosis of Bone and Joint Disorders, 2ª ed., WB Saunders Co.).

Las células madre de tipo embrionario se pueden utilizar para reparar el daño de tejidos y órganos que resultan de enfermedad. En tal realización, se pueden administrar a un paciente células madre de tipo embrionario para regenerar o restaurar tejidos u órganos que han sido dañados como consecuencia de una enfermedad, p. ej., potenciar el sistema inmunológico después de quimioterapia o radiación, reparar tejido cardíaco después de un infarto de miocardio.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de tipos celulares recuperados de perfusato de placenta drenada

Este ejemplo describe el análisis de los tipos de células recuperados del perfusato efluente de una placenta cultivada de acuerdo con los métodos de la invención.

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

La siguiente tabla describe los tipos de células obtenidos por perfusión de una placenta cultivada de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

	WBC 1000/ml	Lym%	MID%	GRA%	Volumen Total	Núm. de Células
CB (Sangre del cordón umbilical)	10,5	43,2	8	48,8	60ml	$6,3 \times 10^8$
PP (Placenta perfusión, temperatura ambiente)	12,0	62,9	18,2	18,9	15 ml	$1,8 \times 10^8$
PP_2 (Placenta perfundida, 37 grados C)	11,7	56,0	19,2	24,8	30 ml	$3,5 \times 10^8$

Las muestras de PP fueron después de Ficoll.

El número total de células de PP después de Ficoll fue de $5,3 \times 10^8$ y el número de CB antes del procesamiento es de $6,3 \times 10^8$. Lym% indica el porcentaje de linfocitos;

MID% indica el porcentaje de glóbulos blancos de la sangre de gama media; y GRA% indica el porcentaje de granulocitos.

Ejemplo 2: Análisis de células obtenidas por perfusión e incubación de la placenta

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

Materiales y métodos

Los donantes de placenta fueron reclutados entre mujeres embarazadas que se inscribieron en programas de bancos privados de sangre de cordón umbilical y proporcionaron el consentimiento informado que permitía el uso de la placenta exanguinada después de la recuperación de la sangre del cordón para fines de investigación. Todos los datos de los donantes son confidenciales. Estos donantes también permitieron el uso los datos ciegos generados a partir del procesamiento normal de sus muestras de sangre de cordón umbilical para la crioconservación. Esto

permitió la comparación entre la composición de la sangre del cordón recogida y el perfusato efluente recuperado utilizando el método experimental descrito a continuación.

Después de la exanguinación de la sangre del cordón del cordón umbilical y la placenta, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, la placenta se colocó en un recipiente aislado, estéril a temperatura ambiente y se entregó al laboratorio en el plazo de 4 horas después del nacimiento. Las placentas se descartaron si, en la inspección, tenían evidencia de daño físico, tal como fragmentación del órgano o avulsión de los vasos umbilicales. Las placentas se mantuvieron a temperatura ambiente (23 más/menos 2 grados C) o refrigeradas (4 grados C) en recipientes estériles durante 2 a 20 horas. Periódicamente, las placentas se sumergieron y se lavaron en solución salina estéril a 25 grados más/menos 3 grados C para eliminar cualquier sangre de la superficie o residuo visible.

El cordón umbilical se cortó transversalmente aproximadamente a 5 cm de su inserción en la placenta y los vasos umbilicales se canularon con catéteres de Teflón o polipropileno conectados a una vía de fluido estéril permitiendo la perfusión bidireccional de la placenta y la recuperación del fluido efluente. Los métodos descritos anteriormente permitieron llevar a cabo todos los aspectos de acondicionamiento, perfusión y recogida de efluente de la placenta en condiciones atmosféricas ambientales controladas, así como la supervisión en tiempo real de la presión intravascular y las velocidades de flujo, las temperaturas del núcleo y el perfusato y los volúmenes de efluente recuperados. Se evaluó una gama de protocolos de acondicionamiento durante un periodo de posparto de 24 horas, y se analizó la composición celular del fluido efluente por citometría de flujo, microscopía óptica y análisis de las unidades formadoras de colonias.

Acondicionamiento de la placenta

Las placentas de las donantes se procesaron a temperatura ambiente en un plazo de 12 y 24 horas después del parto. Antes de su procesamiento, se eliminaron las membranas y se limpió de sangre residual el sitio materno. Los vasos umbilicales se canularon con catéteres elaborados con agujas mariposa de calibre 20 utilizados para la recogida de muestras de sangre.

Las placentas de las donantes se mantuvieron bajo condiciones variables en un intento de simular y mantener un entorno fisiológicamente compatible para la proliferación y el reclutamiento de células madre de tipo embrionario residuales. La cánula se lavó con medio IMDM libre de suero (GibcoBRL, NY) que contenía 2 U/ml de heparina (Elkins-Sinn, NJ). La perfusión de la placenta continuó a una velocidad de 50 ml por minuto hasta que se recogieron aproximadamente 150 ml de perfusato. Este volumen de perfusato se marcó como "fracción temprana". La perfusión continua de la placenta a la misma velocidad dio como resultado la recolección de una segunda fracción de aproximadamente 150 ml y se marcó como "fracción tardía". Durante el curso del procedimiento, la placenta se masajeó suavemente para ayudar al proceso de perfusión y ayudar a la recuperación de material celular. El fluido efluente se recogió desde el circuito de perfusión tanto mediante drenaje por gravedad como por aspiración a través de la cánula arterial.

A continuación las placentas fueron perfundidas con medio Eagle modificado de Dulbecco heparinizado (H.DMEM) (2U/ml) a una velocidad de 15 ml/minuto durante 10 minutos y los perfusatos se recogieron de los sitios maternos en el plazo de una hora y se contaron las células nucleadas. Los procedimientos de perfusión y de recogida se repitieron una vez o dos veces hasta que el número de células nucleadas recuperadas cayó por debajo de 100/ml. Los perfusatos se reunieron y se sometieron a centrifugación suave para eliminar las plaquetas, los desechos y las membranas de las células enucleadas. Las células nucleadas se aislaron a continuación mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque y después del lavado, se resuspendieron en H.DMEM. Para el aislamiento de las células adherentes, se colocaron alícuotas de 5-10 x 10^6 células en cada uno de varios matraces T-75 y se cultivaron con Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM) asequible comercialmente obtenido de BioWhittaker, y se colocaron en una incubadora de cultivo de tejidos (37°C, CO_2 al 5%). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se eliminaron por medio de lavado con PBS, que luego se sustituyó por MSCGM. Los matraces se examinaron diariamente para detectar la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y la expansión de agrupaciones de células fibroblastoides.

Recuperación y aislamiento de células

Las células se recuperaron de los perfusatos mediante centrifugación a X 00 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este procedimiento sirvió para separar las células de los restos contaminantes y las plaquetas. Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio IMDM libre de suero que contenía 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (Gibco BRL, NY). La fracción total de células mononucleares se aisló utilizando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante y la fracción de células mononucleares se resuspendió. Las células se contaron utilizando un hemocitómetro. La viabilidad se evaluó mediante exclusión con azul de trípano. Aislamiento de las células mesenquimales se logró mediante "tripsinización diferencial", utilizando una solución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial fue posible porque las células fibroblastoides se separaron de las superficies de plástico en el plazo de aproximadamente cinco minutos, mientras que las otras poblaciones adherentes necesitaron más de 20-30 minutos de incubación. Las células fibroblastoides separadas se recogieron después de la tripsinización y la neutralización

de la tripsina, utilizando Solución Neutralizadora de Tripsina (TNS, BioWhittaker). Las células se lavaron en H.DMEM y se resuspendieron en MSCGM.

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

Aislamiento de células madre de tipo embrionario placentarias

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

Resultados

La expresión de CD-34, CD-38, y otros marcadores de superficie asociados con células madre sobre las células mononucleares purificadas de la fracción temprana y tardía se evaluó por medio de citometría de flujo. Las células clasificadas, recuperadas se lavaron en PBS y a continuación se tiñeron doblemente con ficoeritrina anti-CD34 e isotiocianato de fluoresceína anti-CD38 (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

El aislamiento de las células se logró mediante el uso de la separación de células magnéticamente, tal como, por ejemplo, Auto Macs (Miltenyi). Preferiblemente, se lleva a cabo en primer lugar el aislamiento de células CD34+.

REIVINDICACIONES

1. Un método de fabricación de una matriz de tejido, que comprende sembrar células madre placentarias aisladas sobre o dentro de una matriz de tejido, en donde las células madre placentarias aisladas no expresan antígenos MHC Clase 2, en donde dichas células madre placentarias son SSAE3$^-$, SSAE4$^-$, OCT-4$^+$ y ABC-p $^+$, en donde dichas células madre placentarias son obtenibles por:

(a) exanguinación de una placenta;

(b) perfusión de la placenta para eliminar sangre residual;

(c) obtención de las células madre placentarias por perfusión de la placenta con una solución de perfusión; y

(d) separación de dichas células madre placentarias de las demás células en dicha solución de perfusión por tripsinización diferencial.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha solución de perfusión comprende un anticoagulante.

3. El método de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la placenta se perfunde haciendo pasar la solución de perfusión a lo largo de la arteria umbilical y/o la vena umbilical de dicha placenta.

4. El método de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la solución de perfusión se recoge de la parte de la placenta que estaba unida a la pared del útero de la madre.

5. El método de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichas células madre placentarias se obtienen de una placenta que ha sido perfundida durante al menos 4 horas.

6. El método de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichas células madre placentarias se obtienen de una placenta que ha sido perfundida durante al menos 12 horas.

7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha tripsinización diferencial comprende dejar que las células en dicha solución de perfusión se unan a una superficie de plástico, seguido de tripsinización con 0,05% de tripsina durante aproximadamente 5 minutos para desunir las células, y recolección de dichas células desunidas, en donde dichas células desunidas son células madre placentarias aisladas.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichas células madre placentarias aisladas han sido expandidas.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dichas células madre placentarias han sido genéticamente modificadas para expresar una proteína.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dichas células madre placentarias aisladas han sido genéticamente modificadas con un vector viral o con un transgen integrado en el genoma de las células.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha placenta es humana.

12. Una matriz de tejido que comprende células madre placentarias humanas, que son SSEA3$^-$, SSEA4$^-$, OCT-4$^+$, y ABC-p$^+$.

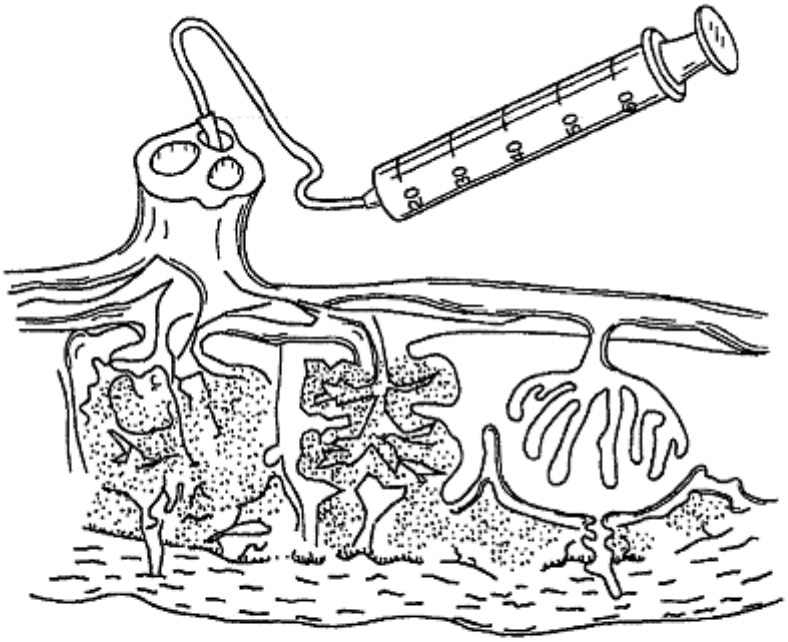

FIG. 1

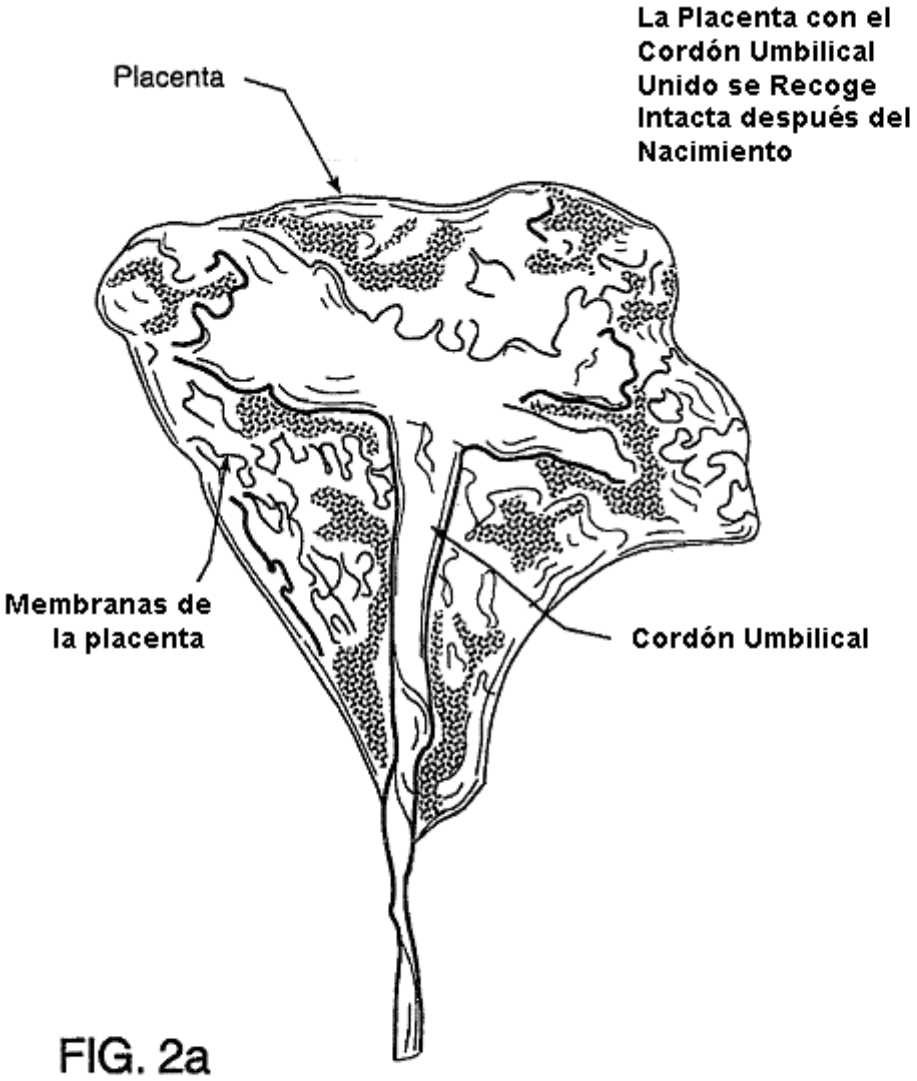
La Placenta con el
Cordón Umbilical
Unido se Recoge
Intacta después del
Nacimiento
Placenta
Membranas de
la placenta
Cordón Umbilical

FIG. 2a

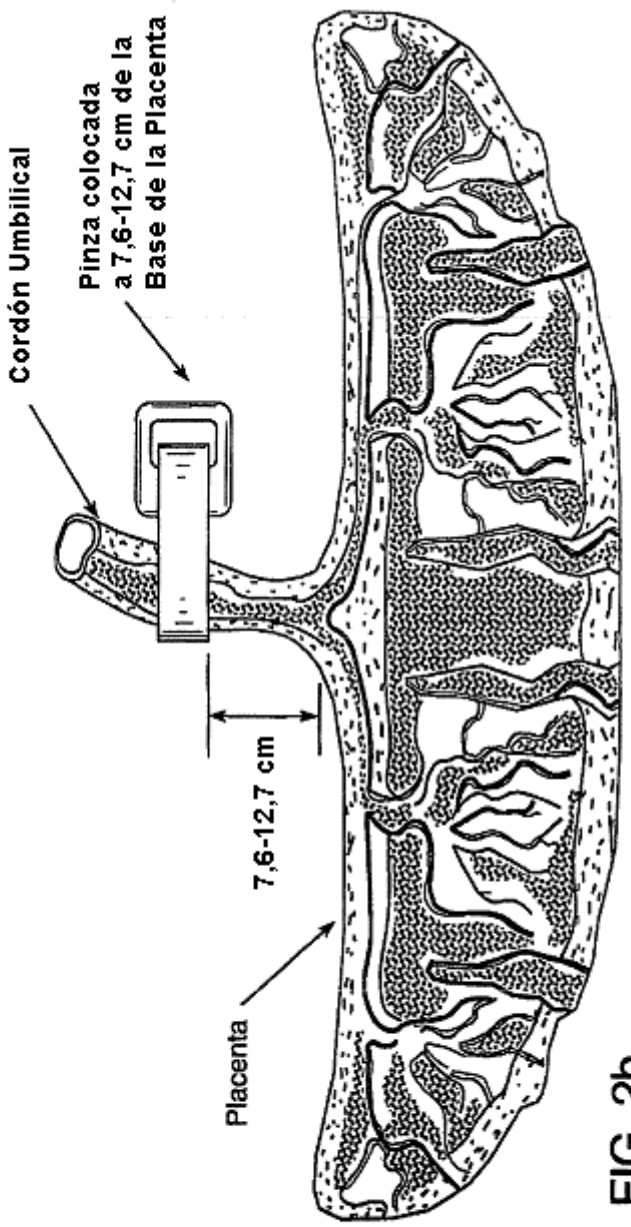
Cordón Umbilical
Pinza colocada
a 7,6-12,7 cm de la
Base de la Placenta
7,6-12,7 cm
Placenta

FIG. 2b

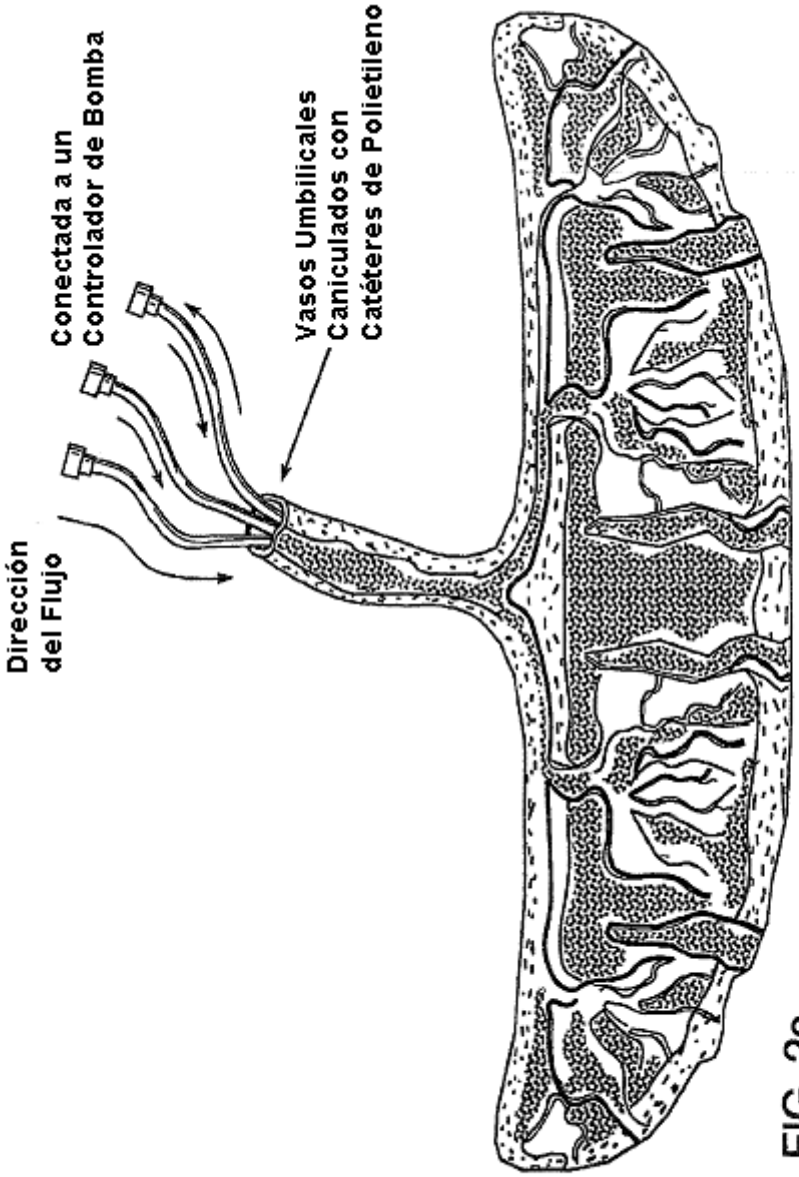
Dirección del Flujo
Conectada a un Controlador de Bomba
Vasos Umbilicales Caniculados con Catéteres de Polietileno

FIG. 2c

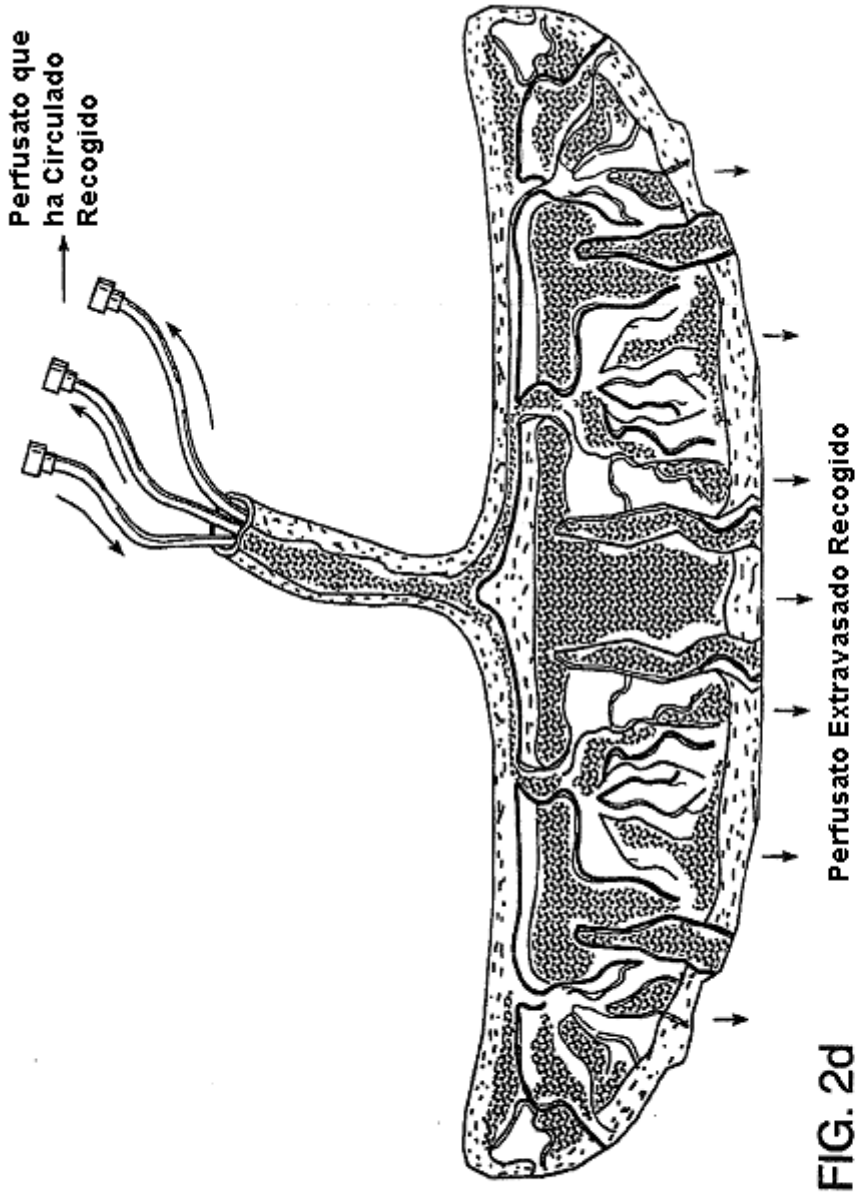
Perfusato que
ha Circulado
Recogido
Perfusato Extravasado Recogido

FIG. 2d

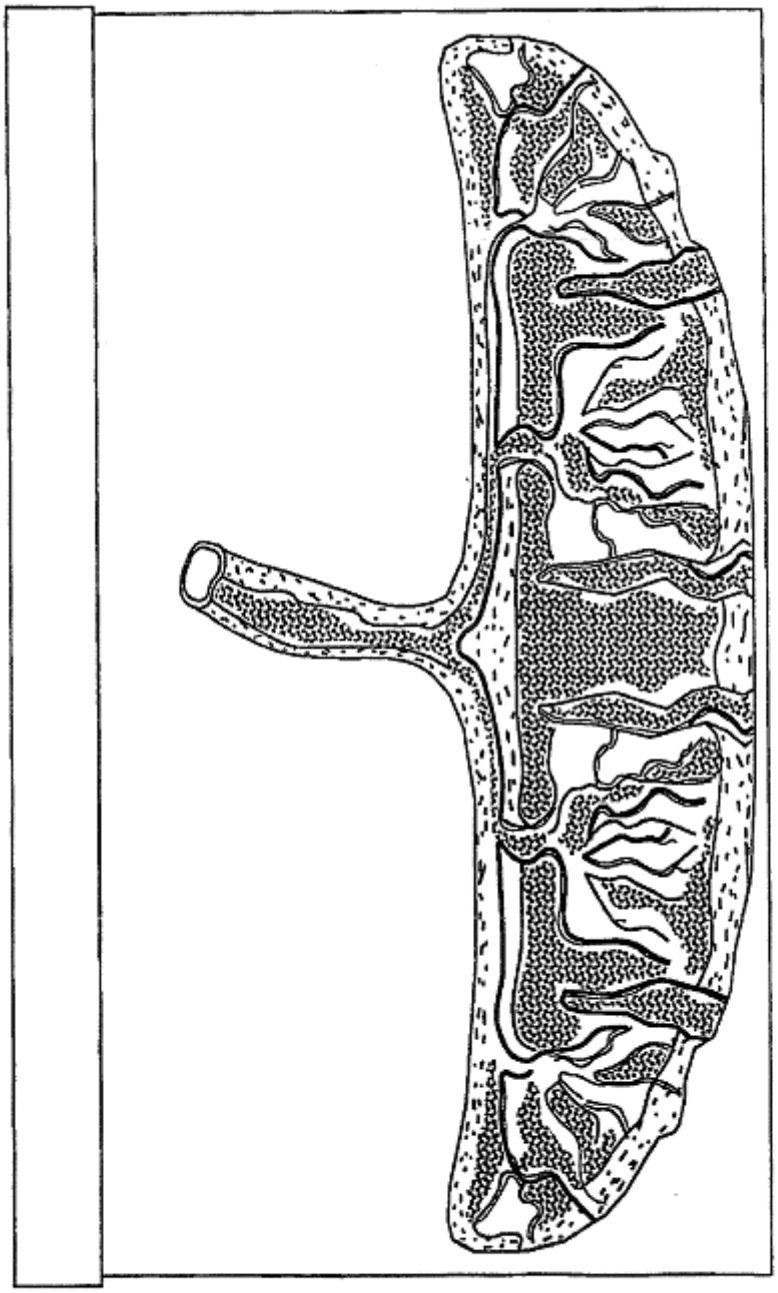

FIG. 2e

Placenta Perfundida, Drenada Almacenada en un Contenedor Hermético

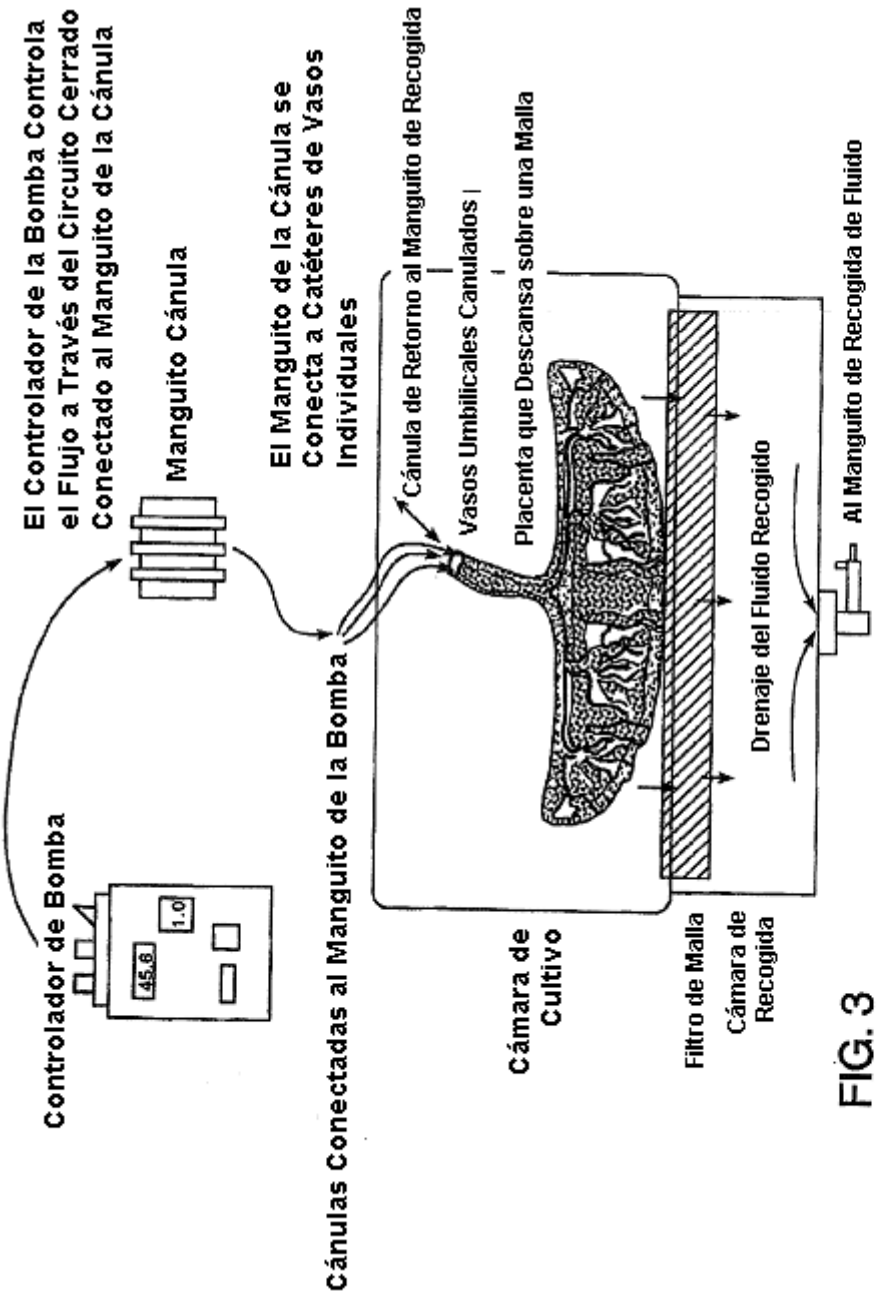
El Controlador de la Bomba Controla el Flujo a Través del Circuito Cerrado Conectado al Manguito de la Cánula
Manguito Cánula
El Manguito de la Cánula se Conecta a Catéteres de Vasos Individuales
Cánula de Retorno al Manguito de Recogida
Vasos Umbilicales Canulados
Placenta que Descansa sobre una Malla
Al Manguito de Recogida de Fluido
Drenaje del Fluido Recogido
Controlador de Bomba
45.6
1.0
Cánulas Conectadas al Manguito de la Bomba
Cámara de Cultivo
Filtro de Malla
Cámara de Recogida

FIG. 3

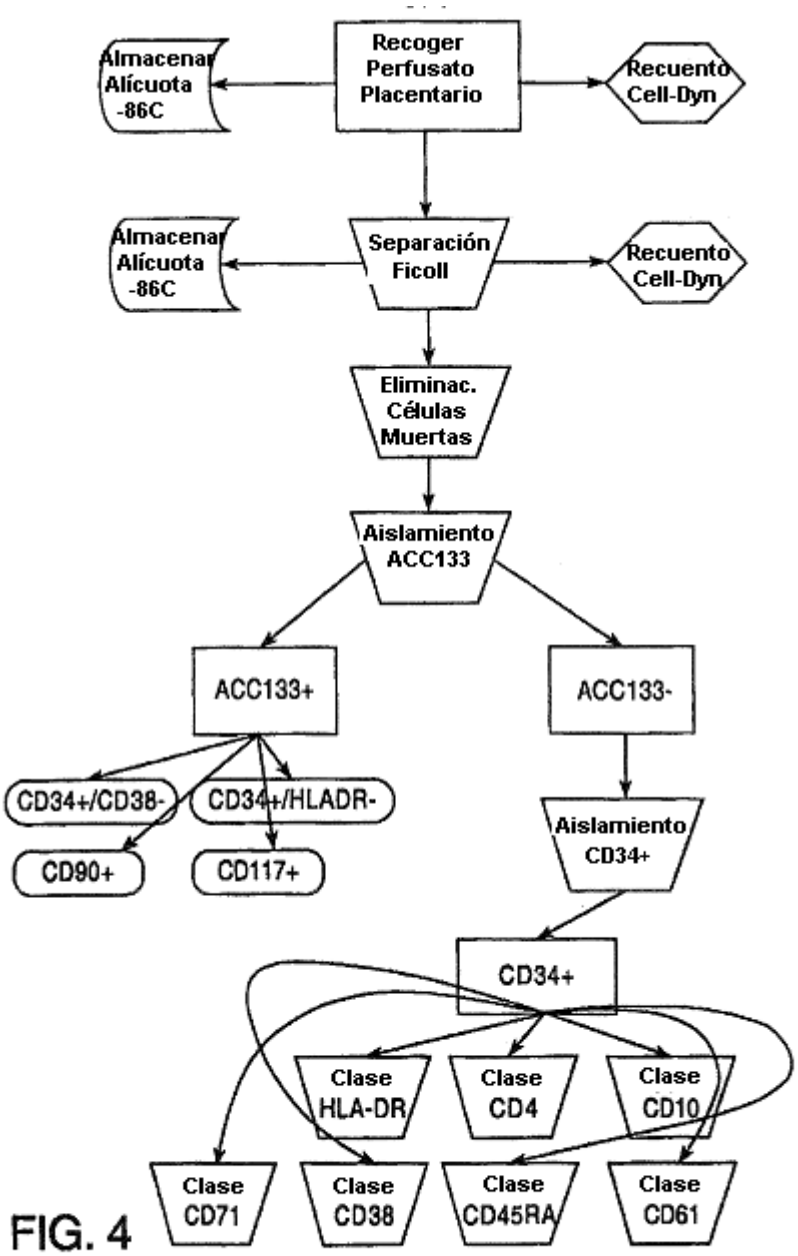
Recoger Perfusato Placentario
Almacenar Alícuota -86C
Recuento Cell-Dyn
Separación Ficoll
Almacenar Alícuota -86C
Recuento Cell-Dyn
Eliminac. Células Muertas
Aislamiento ACC133
ACC133+
ACC133-
CD34+/CD38-
CD34+/HLADR-
CD90+
CD117+
Aislamiento CD34+
CD34+
Clase HLA-DR
Clase CD4
Clase CD10
Clase CD71
Clase CD38
Clase CD45RA
Clase CD61

FIG. 4