

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 750**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2011 PCT/US2011/022333**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO11094181**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2011 E 11701732 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2529007**

54 Título: **Tratamiento de cánceres relacionados con hueso utilizando células madre placentarias**

30 Prioridad:

08.06.2010 US 352768 P

24.02.2010 US 307821 P

26.01.2010 US 298517 P

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

15.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZHANG, XIAOKUI;
YACCOBY, SHMUEL y
ABRAMSON, SASCHA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 646 750 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

Tratamiento de cánceres relacionados con hueso utilizando células madre placentarias

1. Campo de la invención

5 En la presente memoria se proporcionan células madre placentarias adherentes a plástico de cultivo tisular (denominadas en la presente memoria PDAC) para su uso en métodos para tratar cánceres relacionados con hueso, por ejemplo, para suprimir la proliferación de células de cánceres relacionados con hueso, p. ej., células de condrosarcoma, y para suprimir el crecimiento de cánceres relacionados con hueso, por ejemplo, condrosarcoma y otros cánceres relacionados con hueso, p. ej., tumores.

2. Antecedentes de la invención

10 El mieloma múltiple (también conocido como MM, mieloma, mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler) es un tipo de cáncer de células plasmáticas, que son células del sistema inmunitario productoras de anticuerpos. Los síntomas del mieloma múltiple incluyen, osteodinia, infección, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas. La enfermedad se considera incurable, y solo algunos tratamientos, tales como la lenalidomida (REVLIMID®) están disponibles y son prometedores. Como tal, existe la necesidad de nuevos tratamientos para el mieloma múltiple. Hasta la fecha, nadie ha descrito la capacidad de las células madre placentarias, no hematopoyéticas, adherentes a plástico de cultivo tisular para suprimir el crecimiento de cánceres relacionados con hueso o para suprimir la proliferación de células de cánceres relacionados con hueso.

20 Por ejemplo, el documento WO 2008/051568 A2 describe métodos para el tratamiento de defectos óseos utilizando células madre placentarias, incluyendo defectos óseos causados por cáncer. Li Xin et al (2008) describen los resultados de experimentos que examinan el efecto de células adherentes derivadas de placenta humana sobre mieloma múltiple relacionado con enfermedad ósea y proliferación tumoral utilizando ratones. El documento WO 2009/045360 describe el uso de perfundido placentario que comprende linfocitos citolíticos naturales y linfocitos citolíticos naturales de dicho perfundido placentario en métodos de supresión del crecimiento o proliferación de células tumorales.

3. Compendio de la invención

25 En un aspecto de la invención, se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en un método para la supresión de la proliferación de células de un cáncer relacionado con hueso en un individuo humano, en donde el método consiste en poner en contacto dichas células de un cáncer relacionado con hueso, con una pluralidad de células madre placentarias, durante un tiempo suficiente para que dichas células madre placentarias supriman la proliferación de dichas células de un cáncer relacionado con hueso, en comparación con una pluralidad de dichas células de un cáncer relacionado con hueso que no se han puesto en contacto con células madre placentarias, en donde dichas células de un cáncer relacionado con hueso son células de condrosarcoma, células de cáncer de hueso, células de neuroblastoma, células de osteosarcoma, células de sarcoma de Ewing, células de cordoma, células de un histiocitoma fibroso maligno de hueso, o células de un fibrosarcoma de hueso, y en donde dichas células madre placentarias adherentes a plástico de cultivo tisular son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ como puede detectarse por citometría de flujo, y no son trofoblastos, citotrofoblastos o células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

30 En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención son CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺; o CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo.

35 En determinadas realizaciones de las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, dicha puesta en contacto comprende la administración de al menos 1×10^8 de dichas células madre placentarias a dicho individuo humano.

40 En determinadas realizaciones de las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, dicha puesta en contacto comprende administrar dichas células madre placentarias a dicho individuo en una lesión ósea, o adyacente, causada por dicho cáncer relacionado con hueso.

45 En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención suprimen al menos un 50 % la proliferación de dichas células de un cáncer relacionado con hueso en comparación con la proliferación de un número equivalente de células de dicho cáncer relacionado con hueso en ausencia de dichas células placentarias.

50 En otro aspecto de la invención, se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en un método para el tratamiento de un individuo humano que tiene un cáncer relacionado con hueso, en donde el método consiste en la administración a dicho individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias durante un tiempo suficiente para que dichas células madre placentarias mejoren uno o más síntomas, o reduzcan la progresión, de dicho cáncer relacionado con hueso, en donde dicho cáncer relacionado con hueso es

- condrosarcoma, cáncer de hueso, neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, cordoma, histiocitoma fibroso maligno o de hueso, o fibrosarcoma de hueso, y en donde dichas células madre placentarias adherentes a plástico de cultivo celular son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ como puede detectarse por citometría de flujo; y no son trofoblastos, citotrofoblastos o células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, y tienen la capacidad de diferenciarse en células osteogénicas o condrogénicas.
- 5 En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención son CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺; o CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo.
- 10 En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, se administran a dicho individuo humano por vía intravenosa, o en una lesión ósea, o adyacente, causada por dicho cáncer relacionado con hueso.
- En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, comprenden la administración de al menos 1×10^8 células placentarias a dicho individuo humano.
- 15 En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, suprimen al menos un 50 % la proliferación de células de dicho cáncer relacionado con hueso en comparación con la proliferación de un número equivalente de células de dicho cáncer relacionado con hueso en ausencia de dichas células placentarias.
- En lo sucesivo en la presente memoria, la referencia a células madre placentarias en el contexto de la invención y sus realizaciones significa células madre placentarias como se ha definido anteriormente.
- 20 En un aspecto, en la presente memoria se proporcionan células madre placentarias aisladas de la invención para su uso en métodos de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de dichas células madre placentarias adherentes a plástico de cultivo tisular aisladas, también denominadas en la presente memoria PDAC (*Placenta Derived Adherent Cells*, células adherentes derivadas de placenta), de poblaciones aisladas de dichas células madre placentarias, o de poblaciones aisladas de células que comprenden las células madre placentarias.
- 25 En una realización, en la presente memoria se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias mejora, por ejemplo, mejora de manera perceptible, uno o más síntomas de, o reduce, por ejemplo, reduce de forma perceptible, la progresión de dicho cáncer relacionado con hueso. En una realización específica, dicho cáncer relacionado con hueso es condrosarcoma. En otras realizaciones, dicho cáncer relacionado con hueso es cáncer de hueso, neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, cordoma, histiocitoma fibroso maligno de hueso, o fibrosarcoma de hueso. El cáncer relacionado con hueso no es cáncer de próstata. En otras realizaciones, dicho cáncer relacionado con hueso comprende un tumor sólido. En otra realización, dicho individuo es un mamífero. En otra realización, dicho individuo es un ser humano. En otra realización, dicha administración de dichas células madre placentarias da como resultado una mejora mayor, por ejemplo, perceptiblemente mayor, de dicho uno o más síntomas que la administración de un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea. Por ejemplo, dichas células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea son una o más de CD34⁻, CD45⁻ CD73⁺ y / o CD105⁺.
- 30 En determinadas realizaciones, dicho individuo presenta una lesión ósea, p.ej., una lesión ósea causada por dicho cáncer relacionado con hueso, p. ej., una lesión ósea visible en un radiograma de rayos X. En otras realizaciones, dicho individuo no presenta una lesión ósea, p. ej., una lesión ósea causada por dicho cáncer relacionado con hueso, p. ej., una lesión ósea visible en un radiograma de rayos X. En otras realizaciones, dicha administración da como resultado un retraso en la aparición o principio de lesiones óseas, p. ej., lesiones óseas causadas por dicho cáncer relacionado con hueso, p. ej., como puede visualizarse en un radiograma de rayos X, o lesiones óseas causadas por tratamiento de un cancer
- 35 En determinadas realizaciones, dichas células madre placentarias se administran a dicho individuo por vía intravenosa. En otras realizaciones, el uso de las células madre placentarias de la invención comprende administrar a dicho individuo al menos aproximadamente 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} o 1×10^{11} células madre placentarias, en términos de número total de células. En otra realización específica, dichas células madre placentarias, han proliferado *in vitro* durante no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 generaciones poblacionales antes de dicha administración. En otra realización, dichas células madre placentarias se administran a dicho individuo en una lesión ósea, o adyacente a una lesión ósea, p. ej., una lesión ósea causada por dicho cáncer relacionado con hueso. En otra realización, el método de tratamiento comprende adicionalmente administrar a dicho individuo uno o más compuestos antineoplásicos. En otra realización de cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, dichas células madre placentarias y/o BM-MSC se han criopreservado y descongelado antes de dicha administración.
- 50 En una realización, el uso de células madre placentarias de la invención, puede comprender determinar, una o
- 55

5 varias veces antes de dicha administración, y/o una o varias veces después de dicha administración, uno o más de (1) un número o grado de lesiones óseas en dicho individuo; (2) un número de precursores de osteoclastos en dicho individuo; o (3) un número de células de mieloma múltiple en dicho individuo, p. ej., al menos una vez antes y al menos una vez después de dicha administración. En determinadas realizaciones, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias reduce, por ejemplo, reduce de manera perceptible, el número o el grado de gravedad de, o reduce la tasa de aumento en el número de o grado de gravedad, de dichas lesiones óseas en dicho individuo, p. ej., como se determina mediante densitometría ósea o rayos X. En otras realizaciones, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias reduce, p. ej., reduce de manera perceptible, el número de precursores de osteoclastos en dicho individuo, p. ej., como se determina utilizando un anticuerpo específico para precursores de osteoclastos para detectar precursores de osteoclastos, p. ej., en la sangre periférica o en la médula ósea del individuo. En otras realizaciones, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias reduce el número de células cancerosas relacionadas con hueso en dicho individuo, p. ej., como puede determinarse mediante recuento celular (por ejemplo, por citometría de flujo), o tinción de anticuerpo, de células sanguíneas nucleadas de dicho individuo utilizando un anticuerpo específico para dichas células, por ejemplo, células de plasma, por ejemplo, un anticuerpo específico para marcadores celulares CD28 o CD138, o como puede determinarse mediante la evaluación del nivel de proteínas M en la sangre del individuo. En otras realizaciones, dichas células madre placentarias reducen el número de células de dicho cáncer relacionado con hueso en al menos, p. ej., 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% en comparación con el número de dichas células antes de la administración de dichas células madre placentarias.

25 En otra realización, el individuo tiene condrosarcoma; por ej., el cáncer relacionado con hueso es condrosarcoma. En determinadas realizaciones, el uso de células madre placentarias de la invención comprende determinar, una o varias veces antes de dicha administración, y/o una o varias veces después de dicha administración, una o más de diversas células de condrosarcoma en el individuo o el número de lesiones óseas (p. ej., masas causadas por condrosarcoma) en el individuo.

30 En otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en un método para suprimir la proliferación de células de un cáncer relacionado con hueso, que comprende poner en contacto dichas células de un cáncer relacionado con hueso con una pluralidad de células madre placentarias durante un tiempo suficiente para que dichas células madre placentarias supriman, p. ej., supriman de manera perceptible, la proliferación de dichas células de cáncer relacionado con hueso, en comparación con una pluralidad de dichas células de un cáncer relacionado con hueso que no se han puesto en contacto con células madre placentarias, p. ej., como puede determinarse mediante una reducción, por ejemplo, una reducción perceptible, en el número de dichas células cancerosas relacionadas con hueso, o una reducción perceptible en el aumento del número de dichas células cancerosas relacionadas con hueso. En otra realización del método, dichas células de un cáncer relacionado con hueso son células de condrosarcoma. En otras realizaciones, dichas células de un cáncer relacionado con hueso son células de cáncer de hueso, células de neuroblastoma, células de osteosarcoma, células de sarcoma de Ewing, células de cordoma, células de un histiocitoma fibroso maligno de hueso o células de un fibrosarcoma de hueso. En otra realización específica, dichas células de un cáncer relacionado con hueso son parte de un tumor sólido.

40 En determinadas realizaciones del método, dicha puesta en contacto se realiza *in vitro*. En otras realizaciones determinadas, dicha puesta en contacto se realiza *in vivo*. En determinadas realizaciones, dicha puesta en contacto se realiza en un individuo que comprende dichas células de un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, en un individuo que tiene una enfermedad causada por dichas células. En determinadas realizaciones, dicho individuo es un mamífero, por ejemplo, un ser humano. En otra realización específica, dicha puesta en contacto comprende la administración de dichas células madre placentarias a dicho individuo por vía intravenosa. En otra realización específica, dicha puesta en contacto comprende la administración de dichas células madre placentarias a dicho individuo en una lesión ósea, o adyacente a una lesión ósea, en el individuo.

50 En otra realización, el uso de las células madre placentarias de la invención para suprimir la proliferación de células de un cáncer relacionado con hueso, comprende adicionalmente poner en contacto dichas células de un cáncer relacionado con hueso con uno o más compuestos antineoplásicos, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos antineoplásicos. En otra realización, el uso de las células madre placentarias de la invención comprende administrar a dicho individuo al menos aproximadamente 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 o 1×10^{10} células madre placentarias. En determinadas realizaciones, dichas células madre placentarias se han proliferado *in vitro* durante no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 generaciones poblacionales. En otras realizaciones, dichas células madre placentarias de la invención suprimen la proliferación de células de dicho cáncer relacionado con hueso en al menos, por ejemplo, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, en comparación con la proliferación de un número equivalente de células de dicho cáncer relacionado con hueso en ausencia de dichas células madre placentarias, por ejemplo, como puede determinarse mediante una reducción perceptible en el número de dichas células cancerosas relacionadas con hueso, o mediante una reducción perceptible en el aumento de dichas células cancerosas relacionadas con hueso, o como puede determinarse mediante una reducción perceptible en el número y/o gravedad de lesiones de hueso en un individuo que tiene dichas células cancerosas.

En otras realizaciones, dichas células madre placentarias se han crioconservado y descongelado antes de dicha puesta en contacto. En otra realización, el uso de las células madre de la invención comprende determinar que dichas células madre placentarias suprimen, p. ej., suprimen de manera perceptible, la proliferación de una muestra de dichas células de un cáncer relacionado con hueso antes de dicha puesta en contacto.

5 En otra realización el uso de las células madre placentarias de la invención reduce la maduración de precursores de osteoclastos en osteoclastos, cuando dichos precursores de osteoclastos se ponen en contacto con una pluralidad de células madre placentarias, en donde dicha pluralidad de células madre placentarias es un número de células suficiente para reducir, por ejemplo, reducir de forma perceptible, la maduración de osteoclastos de dichos precursores de osteoclastos, por ejemplo, como puede determinarse mediante una reducción perceptible o falta de
10 aumento en el número de osteoclastos como resultado de dicha puesta en contacto. En otra realización, el uso de las células madre placentarias de la invención aumenta la apoptosis de precursores de osteoclastos, cuando dichos precursores de osteoclastos se ponen en contacto con una pluralidad de células madre placentarias en donde dicha pluralidad de células madre placentarias es un número de células suficiente para aumentar, por ejemplo, aumentar de forma perceptible, la apoptosis de precursores de osteoclastos. Dicho aumento en la apoptosis de precursores de
15 osteoclastos puede detectarse mediante un aumento perceptible en la tinción con anexina V y/o yoduro de propidio de precursores de osteoclastos de dicho individuo. En algunos casos, los precursores de osteoclastos están en un individuo, por ejemplo, un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, mieloma múltiple, condrosarcoma, o uno de los otros cánceres relacionados con hueso descritos en la presente memoria. En ciertos otros casos, el método comprende poner en contacto dichos precursores de osteoclastos con lenalidomida, por
20 ejemplo, administrando lenalidomida a un individuo que tiene dichos precursores de osteoclastos.

En determinadas realizaciones de los métodos anteriores, dicha puesta en contacto tiene lugar *in vitro*. En otras realizaciones, dicha puesta en contacto tiene lugar *in vivo*. En otra realización, dicha puesta en contacto tiene lugar en un ser humano. En otra realización, dicha puesta en contacto tiene lugar en un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, un individuo que tiene células de un cáncer relacionado con hueso, o una enfermedad causada por dichas células. En otros casos, dicho individuo es un individuo que tiene mieloma múltiple o células de mieloma múltiple, o en donde dicho individuo tiene al menos un síntoma de mieloma múltiple. En otro caso, dicho individuo tiene al menos una lesión ósea causada por mieloma múltiple.

En determinadas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores, dichas células madre placentarias son:
30 adherentes a plástico de cultivo tisular; (2) CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ como puede detectarse por citometría de flujo; y tienen la capacidad de diferenciarse en células osteogénicas o condrogénicas, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, o ambas cosas. En otra realización, dichas células madre placentarias son adherentes a plástico de cultivo tisular; CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ como puede detectarse por citometría de flujo; y tienen la capacidad de diferenciarse en células que tienen una o más características de células osteogénicas o condrogénicas, por ejemplo, características de osteocitos o condrocitos, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, o ambas cosas. En otras realizaciones, las
35 células madre placentarias tienen adicionalmente la capacidad de diferenciarse en células que tienen una o más características de células neuronales o células neurogénicas, por ejemplo, características de neuronas; una o más características de células gliales, p. ej., características de glía o astrocitos; una o más características de células adipocíticas, p. ej., características de adipocitos; una o más características de las células pancreáticas; y/o una o más características de las células cardíacas. En una realización específica de cada una de las realizaciones de células madre placentarias en esta memoria descriptiva, las células madre placentarias son células madre placentarias aisladas.

En otra realización, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y una o más de CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD166⁺, KDR⁻ o CD133⁻. En una realización más específica, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD166⁺, KDR⁻ y CD133⁻. En otra realización, las células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y uno o más de HLA ABC⁺, HLA DR, DQ, DP⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD98⁻ o PD-L1⁺. En una realización más específica, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, HLA ABC⁺, HLA DR, DQ, DP⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD98⁻ y PD-L1⁺. En otra realización, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y uno o más de CD38⁻, CD45⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD133⁻, HLA-DR, DP, DQ⁻, SSEA3⁻, SSEA4⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, HLA-A,B,C⁺, PDL1⁺, ABC-p⁺ y/u OCT-4⁺, como puede detectarse por citometría de flujo y / o RT-PCR. En otra realización, las células madre placentarias son CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo. En otra realización, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo. En otra realización, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y además, una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺, como puede detectarse por citometría de flujo. En otra realización, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD73⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺ como puede detectarse por citometría de flujo.

En otra realización, dichas células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ son adicionalmente una o más de CD3⁻, CD9⁻, CD117⁻, CD133⁻, CD146⁺, CD166⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A, B, C⁺, HLA-DP, DQ, DR⁻, o Ligando 1 de Muerte programada (PDL1⁺), o cualquier combinación de los mismos. En otra realización específica, dichas células madre placentarias son CD3⁻, CD9⁻, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD73⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻, CD133⁻, CD146⁺, CD166⁺, CD200⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A, B, C⁺, HLA-

DP, DQ, DR- o Ligando 1 de Muerte programada (PDL1)⁺, como puede detectarse por citometría de flujo.

En otra realización, cualquiera de las células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria para su uso en la invención, son adicionalmente ABC-p⁺, como puede detectarse por citometría de flujo, u OCT-4⁺ (POU5F1⁺), por ejemplo, como puede determinarse por RT-PCR, en donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP, *breast cancer resistance protein*) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR, *mitoxantrone resistance protein*)). En otra realización, cualquiera de las células madre placentarias proporcionadas en esta memoria son adicionalmente SSEA3⁻ o SSEA4⁻, por ejemplo, como puede detectarse por citometría de flujo, en donde SSEA3 es Antígeno Embrionario Específico de Fase 3 y SSEA4 es Antígeno Embrionario Específico de Fase 4. En otra realización, cualquiera de las células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria son adicionalmente SSEA3⁻ o SSEA4⁻.

En otra realización cualquiera de las poblaciones de células madre placentarias de células madre placentarias aisladas descritas para su uso en la invención, son adicionalmente una o más de MHC-I⁺ (por ejemplo, HLA-A, B, C⁺), MHC-II⁻ (p. ej., HLA-DP, DQ, DR⁻) o HLA-G⁻. En otra realización, cualquiera de las células madre placentarias proporcionadas en esta memoria son adicionalmente cada una de MHC-I⁺ (p.ej., HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁻ (p.ej., HLA-DP,DQ,DR⁻) y HLA-G⁻.

En otra realización, las células madre placentarias CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente una o más de CD3⁻, CD9⁻, CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD146⁺, CD166⁺, SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente CD44⁺. En otra realización, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente uno o más de CD3⁻, CD9⁻, CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{baja}, CD184/CXCR4⁻, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR- (VEGFR2⁻, HLA-A,B,C⁺, HLA-DP, DQ, DR⁻, HLA-G⁻, o Ligando 1 de Muerte Programada (PDL1)⁺, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144 VE-cadherina^{dim}, CD146⁺, CD166⁺, CD184/CXCR4⁻, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR- (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP, DQ, DR⁻, HLA-G⁻ y Ligando 1 de Muerte Programada (PDL1)⁺.

En otras realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺; adicionalmente dichas células madre placentarias aisladas son CD200⁺ y HLA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺ y CD200⁺; CD200⁺ y OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻; CD73⁺ y CD105⁺; u OCT-4⁺, o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias son CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, y adicionalmente una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, MHC-I⁺ o ABC-p⁺, donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)). En otra realización, dichas células madre placentarias son adicionalmente CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻ y OCT-4⁺. En otra realización, dichas células madre placentarias son adicionalmente CD29⁺, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺ y SH4⁺. En otra realización, dichas células madre placentarias son adicionalmente, CD29⁺, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización, dichas células madre placentarias son adicionalmente, CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, MHC-1⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺. En otra realización, dichas células madre placentarias son adicionalmente OCT-4⁺ y ABC-p⁺. En otra realización, dichas células madre placentarias son adicionalmente SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización, dichas células madre placentarias son adicionalmente OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻ y SSEA4⁻. En una realización específica, dichas células madre placentarias OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻ y SSEA4⁻ son adicionalmente CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺ y SH4⁺. En otra realización, dichas células madre placentarias son adicionalmente OCT-4⁺ y CD34⁻, y cualquiera de SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización, dichas células madre placentarias son adicionalmente CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺ u OCT-4⁺. En un aspecto específico, las células madre placentarias para su uso en la invención son CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ y CD200⁺.

En otra realización, las células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺; y adicionalmente una o más de CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁻, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD106 VCAM⁺, CD144/VE-cadherina^{dim}, CD184/CXCR4⁺, β2-microglobulina^{dim}, MHC-I^{dim}, MHC-II⁻, HLA-G^{dim} y/o PDL1^{dim}. En determinadas realizaciones, dichas células madre placentarias o población de células madre placentarias aisladas, son al adicionalmente al menos CD29⁺ y CD54⁺. En otra realización, dichas células madre placentarias son adicionalmente al menos CD44⁺ y CD106⁺. En alternativa, dichas células madre placentarias son al menos CD29⁺.

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

En otra realización, las células madre placentarias, para su uso en la invención, son células CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺,

- CD200⁺, por ejemplo, las células en el agregado, expresan uno o más genes a un nivel más alto, por ejemplo, un nivel perceptiblemente más alto, que un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, en donde dicho uno o más genes son uno o más, o todos, de ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A, y en donde dichas células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea se han sometido a una serie de pases en cultivo equivalentes al número de pases al que se han sometido dichas células madre placentarias aisladas. En determinadas realizaciones, dicha expresión de dicho uno o más genes se determina, por ejemplo, por RT-PCR o análisis de micromatrices, por ejemplo, utilizando un micromatriz U133-A (Affymetrix). En otra realización, dichas células madre placentarias expresan, p. ej., expresan diferencialmente, dicho uno o más genes cuando se cultivan durante, por ejemplo, entre aproximadamente 3 a aproximadamente 35 generaciones poblacionales, en un medio que comprende DMEM-LG al 60% (por ejemplo, de Gibco) y MCDB-201 al 40% (por ejemplo, de Sigma); suero bovino fetal al 2% (p. ej., de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona 10⁻⁸ M (p. ej., de Sigma); ácido 2-fosfato ascórbico 10⁻⁴ M (p. ej., de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (p. ej., de R & D Systems). En otra realización, dichas células madre placentarias expresan, por ejemplo, expresan diferencialmente, dicho uno o más genes cuando se cultivan durante desde aproximadamente 3 a aproximadamente 35 generaciones poblacionales en un medio que comprende DMEM-LG al 60% (por ejemplo, de Gibco) y MCDB-201 al 40% (por ejemplo, de Sigma); suero bovino fetal al 2% (p. ej., de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona 10⁻⁸ M (p. ej., de Sigma); ácido 2-fosfato ascórbico 10⁻⁴ M (p. ej., de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (p. ej., de R & D Systems).
- En determinadas realizaciones, las células madre placentarias expresan CD200 y ARTS 1 (regulador de aminopeptidasa del factor de necrosis tumoral de tipo 1); ARTS-1 y LRAP (arginina aminopeptidasa derivada de leucocitos); IL6 (interleucina-6) y TGFB2 (factor de crecimiento transformante, beta 2); IL6 y KRT18 (queratina 18); IER3 (respuesta temprana inmediata 3), MEST (homólogo del transcrito específico del mesodermo) y TGFB2; CD200 e IER3; CD200 e IL6; CD200 y KRT18; CD200 y LRAP; CD200 y MEST; CD200 y NFE2L3 (factor nuclear (derivado de eritroide 2) – similar al 3); o CD200 y TGFB2 a un nivel más alto, por ejemplo, a un nivel perceptiblemente más alto, que un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (BM-*MSC*, *bone-marrow-derived mesenchymal stem cells*) en donde dichas células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea se han sometido a una serie de pases en cultivo equivalente al número de pases al que se han sometido dichas células madre placentarias. En otras realizaciones, las células madre placentarias expresan ARTS-1, CD200, IL6 y LRAP; ARTS-1, IL6, TGFB2, IER3, KRT18 y MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 y TGFB2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 y TGFB2; o IER3, MEST y TGFB2 a un nivel más alto, por ejemplo, a un nivel perceptiblemente más alto, que un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, BM-*MSC*, en donde dichas células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea se han sometido a una serie de pases en cultivo equivalente al número de pases al que se han sometido las células madre placentarias.
- En varias realizaciones, dichas células madre placentarias útiles en los métodos descritos en la presente memoria, están contenidas en una población de células, de las cuales, al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células son dichas células madre placentarias. En otras realizaciones determinadas, las células madre placentarias en dicha población de células carecen sustancialmente de células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos un 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células madre placentarias en dicha población tiene un genotipo fetal, es decir, son de origen fetal. En otras realizaciones determinadas, la población de células que comprende dichas células madre placentarias carece sustancialmente de células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos un 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicha población tienen un genotipo fetal, es decir, son de origen fetal. En otras realizaciones determinadas, la población de células que comprende dichas células madre placentarias comprende células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicha población tiene un genotipo materno, es decir, son de origen materno.
- En una realización de cualquiera de las realizaciones de células madre placentarias de la presente memoria, las células madre placentarias facilitan la formación de uno o más cuerpos similares a embriones en una población de células placentarias que comprenden dichas células madre placentarias aisladas cuando se cultiva dicha población bajo condiciones que permiten la formación de un cuerpo similar a un embrión, por ejemplo, un cultivo en condiciones de proliferación).
- En determinadas realizaciones de cualquiera de las células madre placentarias para su uso en la invención, las células son células de mamífero, por ejemplo, de ser humano.
- En determinadas realizaciones, cualquiera de las células madre placentarias para su uso en la invención son

autólogas para un receptor, por ejemplo, para un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, o que tiene un síntoma de un cáncer relacionado con hueso. En otras realizaciones determinadas, dichas células madre placentarias son alogénicas para un receptor, por ejemplo, para un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, o que tiene un síntoma de un cancer relacionado con hueso.

- 5 En determinadas realizaciones, las células madre placentarias de la invención para su uso en los métodos de tratamiento o métodos de supresión de la proliferación de células cancerosas relacionadas con hueso descritas en la presente memoria, se crioconservan antes de dicha administración. En otra realización, dichas células madre placentarias se obtienen de un banco de células, por ejemplo, un banco de células madre placentarias.

- 10 En cualquiera de las realizaciones de células madre placentarias para su uso en la invención, las células madre placentarias generalmente no se diferencian durante el cultivo en medio de crecimiento, es decir, medio formulado para promover la proliferación, por ejemplo, durante la proliferación en medio de crecimiento. En otra realización, dichas células madre placentarias no requieren una capa alimentadora para proliferar, por ejemplo, no requieren una capa alimentadora para proliferar cuando se cultivan en medio de crecimiento. En otra realización, dichas células madre placentarias no se diferencian únicamente en cultivo como resultado del cultivo sin una capa alimentadora de células.

- 15 Las BM-MSA aisladas en la presente memoria, generalmente no se diferencian durante el cultivo en medio de crecimiento, es decir, medio formulado para promover la proliferación, por ejemplo, durante la proliferación en medio de crecimiento. Además, dichas BM-MSA aisladas no requieren una capa alimentadora para proliferar, por ejemplo, no requieren una capa alimentadora para proliferar cuando se cultivan en medio de crecimiento. Dichas BM-MSA aisladas no se diferencian en únicamente en cultivo como resultado del cultivo sin una capa alimentadora de células.

- 20 En determinadas realizaciones, dichas células madre placentarias para su uso en la invención se obtienen por perfusión de una placenta posparto cuya sangre se ha extraído y perfundido para eliminar la sangre residual; cuya sangre se ha extraído pero no se ha perfundido para eliminar la sangre residual; o cuya sangre ni se ha extraído ni perfundido para eliminar la sangre residual. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se obtienen por alteración física y / o enzimática del tejido placentario. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se obtienen cultivando una porción de una placenta y permitiendo que las células madre placentarias proliferen fuera de dicha porción de placenta.

- 25 Más adelante, en la Sección 5.2, se describen con detalle los marcadores de superficie celular, los marcadores moleculares y los marcadores genéticos característicos de las células madre placentarias útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria.

- 30 En otra realización específica de las células madre placentarias para su uso en la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de dichas células madre placentarias es una cantidad de células que da como resultado la eliminación de, una mejora perceptible en, la disminución de la gravedad de, o la disminución de la velocidad de la progresión de uno o más síntomas de, un cáncer relacionado con hueso. En una realización específica, dicho síntoma de un cáncer relacionado con hueso, es una lesión ósea. En otra realización específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias aumenta, por ejemplo, aumenta de forma perceptible, la densidad mineral ósea (BMD, *bone mineral density*) en al menos un hueso de un individuo que recibe las células, por ejemplo, tal y como se mide por densitometría, o contenido mineral óseo (BMC, *bone mineral content*), por ejemplo, tal como se mide por densitometría. En otra realización específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias reduce, p. ej., reduce de forma perceptible, una lesión ósea, por ejemplo, al menos una lesión ósea, causada por dicho cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, tal como es como visible por rayos X, RM o TAC, o similar.

- 35 En otra realización específica, dichas células madre placentarias para su uso en la invención se administran a un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, en, o adyacente a, una lesión ósea causada por dicho cáncer relacionado con hueso, es decir, por vía intralesional. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas se administran mediante inyección en embolada. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se administran por infusión intravenosa. En una realización específica, dicha infusión intravenosa es infusión intravenosa durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 8 horas. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se administran por vía intracraneal. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas se administran por vía intraperitoneal. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se administran por vía intraarterial. En otra realización específica dichas células madre placentarias se administran por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea o intraocular.

- 40 En otra realización dichas células madre placentarias para su uso en la invención, se administran implantando quirúrgicamente a dicho individuo una composición de materia que comprende dichas células, por ejemplo, en, o adyacente a, una lesión ósea causada por un cáncer relacionado con hueso. En una realización específica, dicha composición de materia es una matriz o un armazón. En otra realización específica, dicha matriz o armazón es un hidrogel. En otra realización específica, dicha matriz o armazón es un tejido descelularizado. En otra realización específica, dicha matriz o armazón es una composición sintética biodegradable. En otra realización específica, dicha matriz o armazón es una espuma. En otra realización específica, dicha matriz o armazón es un material cerámico

fisiológicamente aceptable, por ejemplo, mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri- y tetra fosfato de calcio, hidroxiapatita, una fluoroapatita, un sulfato de calcio, un fluoruro de calcio, un óxido de calcio, un carbonato de calcio, un fosfato de calcio y magnesio, un vidrio biológicamente activo (por ejemplo, BIOGLASS®) o una mezcla de cualquiera de ellos. En otra realización específica, dicha matriz o armazón es un material cerámico biocompatible poroso (por ejemplo, SURGIBONE®, ENDOBON®, CEROS® o similar) o un producto mineralizado de injerto de colágeno óseo (por ejemplo, HEALOS™, VITOSS®, RHAKOSS™ y CORTOSS®, o similares).

En otra realización específica, dichas células madre placentarias para su uso en la invención, se administran una vez a dicho individuo. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se administran a dicho individuo en dos o más administraciones distintas. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^4 y 1×10^5 células madre placentarias, por ejemplo, por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^5 y 1×10^6 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^6 y 1×10^7 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^7 y 1×10^8 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo. En otras realizaciones específicas, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 2×10^6 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 2×10^6 y aproximadamente 3×10^6 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 3×10^6 y aproximadamente 4×10^6 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 4×10^6 y aproximadamente 5×10^6 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 5×10^6 y aproximadamente 6×10^6 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 6×10^6 y aproximadamente 7×10^6 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 7×10^6 y aproximadamente 8×10^6 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 8×10^6 y aproximadamente 9×10^6 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo; o entre aproximadamente 9×10^6 y aproximadamente 1×10^7 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar a dicho individuo entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 2×10^7 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar a dicho individuo entre aproximadamente $1,3 \times 10^7$ y aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar a dicho individuo hasta aproximadamente 3×10^7 células madre placentarias por kilogramo de dicho individuo. En una realización específica, dicha administración comprende administrar a dicho individuo entre aproximadamente 5×10^6 y aproximadamente 2×10^7 células madre placentarias. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar a dicho individuo aproximadamente 150×10^6 células madre placentarias en aproximadamente 20 mililitros de solución.

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

En otra realización específica, dicha administración comprende administrar, por vía intravenosa, entre aproximadamente 5×10^7 y 3×10^9 células madre placentarias. En realizaciones específicas, dicha administración comprende administrar, por vía intravenosa, aproximadamente 9×10^8 células madre placentarias o aproximadamente $1,8 \times 10^9$ células madre placentarias. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar, por vía intralesional, entre aproximadamente 5×10^7 y 1×10^8 células madre placentarias. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar, por vía intralesional, aproximadamente 9×10^7 células madre placentarias.

En otra realización específica del método de tratamiento, dichas células madre placentarias se administran a dicho individuo a los 21-30 días, por ejemplo, a los 21 días; a los 7 días; a las 48 horas; o a las 24 horas del diagnóstico de un cáncer relacionado con hueso, como se describe en la presente invención, o del desarrollo de uno o más síntomas de un cáncer relacionado con hueso.

Las células madre placentarias utilizadas en los métodos proporcionados en la presente memoria pueden, en determinadas realizaciones, modificarse mediante ingeniería genética para producir una o más proteínas que suprimen el crecimiento o la proliferación de células de un cáncer relacionado con hueso, como se describe en la presente invención. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, dicha una o más proteínas pueden comprender osteoprotegerina, una o más proteínas morfogenéticas óseas (BMP, *bone morphogenetic proteins*); una o más conexinas, por ejemplo, conexina 26 (Cx26) y/o conexina 43 (Cx43); osteocontina; o activina A. En otras realizaciones, las células madre placentarias se han modificado mediante ingeniería genética para expresar IFN- β o IL-2 exógenos, por ejemplo, en una cantidad que da como resultado una mayor supresión, p. ej., perceptiblemente mayor, de la proliferación celular tumoral, cuando dichas células tumorales se ponen en contacto con dichas células madre placentarias, en comparación con dichas células que no expresan IFN- β o IL-2 exógenos. En la presente memoria también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden dichas células madre placentarias modificadas mediante ingeniería genética, para su uso en la supresión del crecimiento o proliferación de dichas

células cancerosas relacionadas con hueso, o para tratar a un individuo que tenga dichas células cancerosas relacionadas con hueso.

3.1 Definiciones

5 Según se usa en esta memoria, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor numérico establecido, indica un valor dentro de más o menos 10% del valor numérico establecido.

10 Como se usa en la presente memoria, "lesión ósea", en el contexto de un cáncer relacionado con hueso, significa una anomalía en el crecimiento o estructura de un hueso, ocasionada por el cáncer relacionado con hueso, o que es un síntoma de dicho cáncer. En un ejemplo no limitante, el mieloma múltiple generalmente causa lesiones óseas líticas, que son áreas socavadas de un hueso causadas por la desmineralización del hueso. En otro ejemplo no limitante, el condrosarcoma generalmente causa lesiones caracterizadas por un crecimiento en uno o más huesos, que generalmente comprende un crecimiento cartilaginoso que puede calcificarse.

15 Como se usa en esta memoria, las "células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea", también denominadas BM-MSK, se refieren a células madre mesenquimatosas obtenidas de médula ósea, o cultivadas a partir de células madre mesenquimatosas obtenidas de médula ósea, por ejemplo, las células descritas en la Patente de Estados Unidos N° 5.486.359.

20 Como se usa en esta memoria, el término "cáncer relacionado con hueso" se refiere a un cáncer que, en cualquier fase de la enfermedad, afecta o metastatiza a uno o más huesos en un individuo que tiene el cáncer. Por ejemplo, el mieloma múltiple es un cáncer relacionado con hueso porque el cáncer afecta a los huesos; un aspecto del mieloma múltiple es el desarrollo de lesiones óseas debidas, al menos en parte, a la regulación positiva de la actividad osteoclástica resultante de las citocinas secretadas por las células de mieloma múltiple.

25 Como se usa en esta memoria, "poner en contacto", en el contexto de poner en contacto las células madre placentarias con células de un cáncer relacionado con hueso, incluye, pero no requiere, poner las células próximas entre sí, de tal manera que realmente entren en contacto físicamente entre sí, (p. ej., en cocultivo, en una placa multicelular o similar), y poner las células en el mismo espacio, sin contacto físico real, pero en el mismo espacio, por ejemplo, en un sistema de cultivo TRANSWELL® o administración a un individuo, por ejemplo, un ser humano. "Poner en contacto", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye asociar *in vitro* las células madre placentarias y las células de cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, en un solo recipiente (por ejemplo, una placa de cultivo, un matraz, un vial, etc.). "Poner en contacto" también incluye asociar *in vivo* las células madre placentarias y las células tumorales, por ejemplo, en el mismo individuo (por ejemplo, en un mamífero, por ejemplo, en un ratón, una rata, un perro, un gato, una oveja, una cabra, un caballo, un ser humano, etc.). Por ejemplo, las células madre placentarias pueden ponerse en contacto con células cancerosas relacionadas con hueso administrando, por vía intravenosa a un individuo que tiene dicho cáncer relacionado con hueso, las células madre placentarias, o mediante inyección directa en el lugar de un tumor, por ejemplo, en una lesión ósea causada por un cáncer relacionado con hueso, o similar. Las células madre placentarias pueden ponerse en contacto con células cancerosas relacionadas con hueso administrando, por vía intravenosa, por ejemplo, a un animal experimental, las células madre placentarias y las células cancerosas relacionadas con hueso,

35 Como se usa en esta memoria, el término "SH2" se refiere a un anticuerpo que se une a un epítipo en el marcador celular CD105. Por lo tanto, las células a las que se hace referencia como SH2⁺ son CD105⁺.

40 Como se usa en esta memoria, los términos "SH3" y SH4 "se refieren a anticuerpos que se unen a epítipos presentes en el marcador celular CD73. Por lo tanto, las células a las que se hace referencia como SH3⁺ y/o SH4⁺ son CD73⁺.

45 Una placenta tiene el genotipo del feto que se desarrolla en su interior, pero también está en estrecho contacto físico con los tejidos maternos durante la gestación. Como tal, como se usa en la presente memoria, la expresión "genotipo fetal" significa el genotipo del feto, por ejemplo, el genotipo del feto asociado a la placenta a partir de la cual se obtienen células madre placentarias aisladas particulares, como se describe en esta memoria, a diferencia del genotipo de la madre que gestaba el feto. Tal como se usa en esta memoria, la expresión "genotipo materno" significa el genotipo de la madre que gestaba el feto, por ejemplo, el feto asociado a la placenta a partir de la cual se obtienen células madre placentarias aisladas particulares, como se describe en la presente memoria.

50 Como se usa en esta memoria, las células madre, p. ej., las células madre placentarias, se "aislan" si al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o al menos el 99% de las otras células con las que las células madre se asocian de manera natural, se elimina de las células madre, por ejemplo, durante la recogida y/o cultivo de las células madre.

55 Como se usa en esta memoria, "multipotente", cuando se refiere a una célula, significa que la célula tiene la capacidad de diferenciarse en algunos, pero no necesariamente en todos, tipos de células del cuerpo, o en células que tienen características de algunos, pero no de todos, los tipos de células del cuerpo, o en células de una o más de las tres capas germinales. En determinadas realizaciones, por ejemplo, las células madre placentarias (PDAC, *Placenta Derived Adherent Cells*, células adherentes derivadas de placenta) aisladas, como se describe más

adelante en la Sección 5.2, que tienen la capacidad de diferenciarse en células que tienen características de células neurogénicas, condrogénicas y/u osteogénicas son células multipotentes.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "población de células aislada" significa una población de células que está sustancialmente separada de otras células del tejido, por ejemplo, placenta, de la que se obtiene o aísla la población de células. En determinadas realizaciones, la población de células se separa de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de otras células del tejido, por ejemplo, placenta, de la que se obtiene o aísla la población de células.

10 Como se usa en la presente memoria, la expresión "célula madre placentaria" se refiere a una célula madre o célula progenitora que procede de una placenta mamaria, por ejemplo, como se describe a continuación, ya sea como un aislado primario o como una célula cultivada independientemente de si la célula es una célula primaria, parte de un cultivo celular primario, o de si procede de la realización de pases después de un cultivo primario. Una célula, por ejemplo, una "célula madre placentaria", se considera una "célula madre" si la célula muestra uno, dos o los tres marcadores o perfiles de expresión génica asociados a uno o más tipos de células madre; la capacidad de replicarse al menos 10-40 veces en cultivo; y la capacidad de diferenciarse en células que muestran características de células diferenciadas de una o más de las tres capas germinales. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, el término "placentario(a)" incluye el cordón umbilical. En determinadas realizaciones, las células placentarias aisladas, p. ej., células madre placentarias descritas en la presente memoria, se diferencian en *in vitro* (en condiciones diferenciadoras), se diferencian *in vivo* o ambas cosas.

20 Como se usa en la presente memoria, una célula o población de células es "positiva" para un marcador particular, cuando este marcador puede detectarse por encima del fondo, por ejemplo, a través de detección mediada por anticuerpos o mediada por ácidos nucleicos. La detección de un marcador particular puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando anticuerpos, o sondas de oligonucleótidos o cebadores basados en la secuencia del gen o ARNm que codifica el marcador. Por ejemplo, una célula madre placentaria es positiva, por ejemplo, para CD73 porque CD73 es perceptible en células madre placentarias en una cantidad mayor, por ejemplo, perceptiblemente mayor, 25 que el fondo (en comparación, por ejemplo, con un control de isotipo de anticuerpo). Una célula también es positiva para un marcador cuando ese marcador puede utilizarse para distinguir la célula de al menos otro tipo de célula, o cuando puede utilizarse para seleccionar o aislar la célula cuando está presente o lo expresa la célula. En el contexto, por ejemplo, de detección "positiva", mediada por anticuerpo, como indicativo de que está presente un marcador de superficie celular particular, significa que el marcador es perceptible utilizando un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo marcado con fluorescencia, específico para ese marcador; "positiva" también se refiere a una célula que presenta el marcador en una cantidad que produce una señal, por ejemplo, en un citómetro, que está por encima, por ejemplo, de forma perceptible, por encima del fondo. Por ejemplo, una célula es "CD200⁺" cuando la célula está marcada, por ejemplo, está marcada de manera perceptible, con un anticuerpo específico para CD200, y la señal del anticuerpo es más alta, por ejemplo, perceptiblemente más alta, que la de un control (por ejemplo, un control de fondo o un control de isotipo). Se puede determinar que una célula o población de células es OCT-4⁺ si la cantidad de ARN de OCT-4 detectada en el ARN de la célula o población de células, es perceptiblemente mayor que el fondo, como se determina, por ejemplo, mediante un método de detección de ARN, tal como RT-PCR, transferencias por ranura, etc. En ciertas realizaciones, se determina que OCT-4 está presente, y una célula es "OCT-4⁺" si OCT-4 es perceptible utilizando RT-PCR. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, 35 utilizando anticuerpos, se detectan marcadores de grupos de diferenciación ("GD"). Con respecto a HLA-G, una población de células madre placentarias es, en determinadas realizaciones, positiva para HLA-G, si más del 5% de las células en la población son positivas para HLA-G, p. ej., se tiñen de forma perceptible con un anticuerpo contra HLA-G.

45 Como se usa en esta memoria para todos los marcadores excepto para HLA-G, una célula madre placentaria es "negativa" para un marcador celular particular, si el marcador celular no es perceptible, por ejemplo, utilizando un anticuerpo específico para ese marcador en comparación con un control (por ej., un control de fondo o de isotipo), o no es perceptible utilizando un método de detección basado en ácidos nucleicos, p. ej., RT-PCR. Por ejemplo, una célula es "CD34⁻" cuando la célula no se marca perceptiblemente, de manera reproducible, con un anticuerpo específico contra CD34 en un grado mayor que un control (p. ej., un control de fondo o de isotipo). Los marcadores, p. ej., marcadores no detectados, o no perceptibles, utilizando anticuerpos, pueden determinarse para ser positivos o negativos de una manera similar, utilizando un control apropiado, utilizando otros métodos de detección, por ejemplo, mediados por ácidos nucleicos. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, los marcadores de grupos de diferenciación ("GD") se detectan utilizando anticuerpos. Con respecto a HLA-G, una población de células madre placentarias es, en determinadas realizaciones, negativa para HLA-G si el 5% o menos 50 de las células en la población son positivas para HLA-G, p. ej., se tiñen perceptiblemente con un anticuerpo contra HLA-G.

60 Como se usa en esta memoria, la designación "baja" o "dim.", cuando se hace referencia a la expresión de un marcador perceptible en la citometría de flujo, significa que el marcador se expresa en un porcentaje menor de 10% de las células ensayadas, o que la fluorescencia atribuible al marcador, por ejemplo, en la citometría de flujo, es menor que 1 log por encima del fondo.

Como se usa en esta memoria, "tratar" incluye la curación, la remediación, la mejoría, la disminución de la gravedad,

o la reducción de la evolución, de una enfermedad, un trastorno o una afección, o de cualquier parámetro o síntoma de los mismos.

4. Breve descripción de las figuras

- 5 FIG 1: Las células madre placentarias mejoran la reparación de defectos óseos en ratas experimentales. Eje Y: grado de cierre del defecto óseo del cráneo, según lo evaluado por área. Eje X - condiciones:
- HEALOS® solo; HEALOS® en combinación con proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2); HEALOS® y células madre placentarias; HEALOS® y células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (BM-MSC); o sin reparación (vacío). El asterisco indica una mejora significativa ($p < 0,05$) en la reparación del defecto en HEALOS® en combinación con la proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2); HEALOS® en combinación con células madre placentarias; y HEALOS® en combinación con BM-MSC, en comparación con controles.
- 10 FIG 2: Las células madre placentarias suprimen la diferenciación de precursores de osteoclastos. Eje X: osteoclastos (OC); precursores de osteoclastos no cultivados conjuntamente con células madre placentarias, o células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (BM-MSC). Eje Y: números de osteoclastos maduros.
- 15 FIG 3: Las células madre placentarias reducen el crecimiento de las células tumorales de diferentes individuos. Se transfectaron células de mieloma múltiple (líneas celulares BN, JB, ARP1, U266, Dn y Hale) con un gen que codificaba la luciferasa y se cultivaron conjuntamente con células madre mesenquimatosas fetales (FB-MSC) (de izquierda a derecha en cada condición), con células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea de un paciente (Pt-MSC) o con células madre placentarias. Después de varias semanas, la reducción del crecimiento celular del mieloma múltiple se expresó como el valor en veces de la expresión de la luciferasa en células de mieloma múltiple cultivadas conjuntamente con células madre placentarias o Pt-MSC en comparación con la expresión de la luciferasa por células de mieloma múltiple cultivadas conjuntamente con FB-MSC.
- 20 FIG 4: Diagrama de un experimento TRANSWELL®, en donde células madre placentarias o células madre mesenquimatosas se cultivan en la parte inferior de una membrana, y células de mieloma múltiple se cultivan en la parte superior de la membrana.
- 25 FIG. 5: Supresión de células de mieloma múltiple de seis pacientes diferentes (eje X) por células madre placentarias (PDAC) y células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea fetal (MSC fetal). Eje Y: porcentaje de viabilidad en comparación con células de mieloma cultivadas en ausencia de células madre placentarias.
- 30 FIG 6: Las células madre placentarias reducen el crecimiento de las células de mieloma múltiple en ratones SCID-rab / SCID-hu. El número de células de mieloma múltiple se evaluó mediante el título de anticuerpo humano presente en sueros de ratones, evaluado mediante ensayo ELISA. Pre-Rx: título de anticuerpo humano antes de la administración de células de mieloma. 2WK, 4WK: título de anticuerpo humano dos semanas y cuatro semanas después de la administración de células de mieloma múltiple, ya sea solo (control) o con células madre placentarias.
- 35 FIG 7: Cambio en la densidad de masa ósea, valuado mediante rayos X, de implantes óseos en ratones SCID-rab / SCID-hu. BMD (*bone mineral density*, densidad mineral ósea).
- 40 FIGs 8-9: los efectos de las células madre placentarias sobre la enfermedad ósea de mieloma y el crecimiento tumoral dependen de la dosis y son comparables a los de las MSC fetales. Ratones SCID-rab injertados con células de mieloma de 2 pacientes. (A-C) Tras el establecimiento de una carga tumoral alta, los hospedadores recibieron inyección, por vía intralesional, de vehículo con $0,1$, $0,5$ y 1×10^6 células madre placentarias, o un injerto, por vía subcutánea, de 5×10^6 células madre placentarias, utilizando un transportador de hidrogel HyStem-C (para más detalles véase el apartado Métodos) (6-7 ratones / grupo).
- 45 FIG 8: Cambios en la inmunoglobulina humana (Ig) antes del tratamiento (Pre-Rx), 2 y 4 semanas después del tratamiento con células madre placentarias. IL = administración intralesional de $0,1$, $0,5$ o 1×10^6 células. SC = administración subcutánea de células. CONT = control (sin células).
- FIG 9: Cambios en la densidad mineral ósea a partir de niveles de pretratamiento del hueso mielomatoso implantado. IL = administración intralesional de $0,1$, $0,5$ o 1×10^6 células. SC = administración subcutánea de células. CONT = control (sin células).
- 50 FIG 10: Los hospedadores recibieron una inyección intralesional de vehículo, o de 1×10^6 células madre placentarias o MSC. La Figura 10 muestra los cambios en la densidad mineral ósea a partir de los niveles de pretratamiento del hueso mielomatoso implantado. Condición a la izquierda: control (sin células); condición central: células madre placentarias; condición a la derecha: células madre mesenquimatosas derivadas de la médula ósea.
- FIG 11: Los hospedadores recibieron una inyección intralesional de vehículo, o de 1×10^6 células madre placentarias o MSC. La Figura 11 muestra los cambios en la Ig humana antes del tratamiento (Pre-Rx) y al final del experimento. Condición a la izquierda: control (sin células); condición central: células madre placentarias; condición a la derecha: células madre mesenquimatosas derivadas de la médula ósea.

FIG 12: Comparación del número promedio (n = 3) de células de línea celular de mieloma múltiple (U-266, RPMI-8226, L363 y OMP-2) por pocillo con o sin células madre placentarias el día 5 del cultivo o cocultivo. Se proporcionan valores de P para condiciones de control y experimentales para cada línea celular de mieloma múltiple.

5 FIGs 13A-13C: Reducción de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) en Serina 780 (S780), o en las serinas 807 y 811 (S807/S811) para las líneas celulares de mieloma múltiple H929 (Figura 13A), OPM-2 (Fig. 13B) y LP1 (Fig. 13C). D2: Día 2 de cocultivo. D4: Día 4 de cocultivo. GM: media geométrica de aumento/disminución en la fosforilación de Rb. Δ: cambio en la media geométrica.

FIG 14: Número de osteoclastos formados cuando se cultivaron en presencia de lenalidomida 1 μM. La línea horizontal gruesa representa el número de osteoclastos formados en los pocillos de control.

10 FIG 15: Número de osteoclastos formados cuando se cocultivaron solo con células madre placentarias (PDAC), con células madre mesenquimatosas derivadas de la médula ósea (BM-MCS) o con la combinación de células madre placentarias (PDAC) y lenalidomida.

5. Descripción detallada

15 5.1 CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS PARA SU USO EN MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER RELACIONADO CON HUESO

En un aspecto de la invención, se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en un método para la supresión de la proliferación de células de un cáncer relacionado con hueso en un individuo humano, en donde el método consiste en poner en contacto dichas células de un cáncer relacionado con hueso con una pluralidad de células madre placentarias durante un tiempo suficiente para que dichas células madre placentarias supriman la proliferación de dichas células de un cáncer relacionado con hueso, en comparación con una pluralidad de dichas células de un cáncer relacionado con hueso que no se han puesto en contacto con células madre placentarias, en donde dichas células de un cáncer relacionado con hueso, son células de condrosarcoma, células de cáncer de hueso, células de neuroblastoma, células de osteosarcoma, células de sarcoma de Ewing, células de cordoma, células de un histiocitoma fibroso maligno de hueso, o células de un fibrosarcoma de hueso, y en donde dichas células madre placentarias son adherentes a plástico de cultivo tisular, son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo, y no son trofoblastos, citotrofoblastos o células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención son CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺; o CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo.

En determinadas realizaciones de las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, dicha puesta en contacto comprende la administración de al menos 1×10^8 de dichas células madre placentarias a dicho individuo humano.

En determinadas realizaciones de las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, dicha puesta en contacto comprende la administración de dichas células madre placentarias a dicho individuo humano en, o adyacente a, una lesión ósea causada por dicho cáncer relacionado con hueso.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, suprimen al menos un 50 % la proliferación de dichas células de un cáncer relacionado con hueso en comparación con la proliferación de un número equivalente de células de dicho cáncer relacionado con hueso en ausencia de dichas células placentarias.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en un método para el tratamiento de un individuo humano que tiene un cáncer relacionado con hueso, en donde el método consiste en la administración a dicho individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias durante un tiempo suficiente para que dichas células madre placentarias mejoren uno o más síntomas de, o reduzcan la progresión de, dicho cáncer relacionado con hueso, en donde dicho cáncer relacionado con hueso es condrosarcoma, cáncer de hueso, neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, cordoma, histiocitoma fibroso maligno de hueso, o fibrosarcoma de hueso, y en donde dichas células madre placentarias son adherentes a plástico de cultivo tisular, son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo, y no son trofoblastos, citotrofoblastos o células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, y tienen la capacidad de diferenciarse en células osteogénicas o condrogénicas.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención son CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺; o CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, se administran a dicho individuo humano por vía intravenosa, o en, o adyacente a, una lesión ósea causada por dicho cáncer

relacionado con hueso.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, comprenden la administración de al menos 1×10^8 células placentarias a dicho individuo humano.

5 En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, suprimen al menos un 50 % la proliferación de células de dicho cáncer relacionado con hueso en comparación con la proliferación de un número equivalente de células de dicho cáncer relacionado con hueso en ausencia de dichas células placentarias.

10 En la presente memoria se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en métodos de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, que comprende administrar al individuo células madre placentarias aisladas, en particular, las células madre placentarias aisladas de la invención y descritas con detalle en la Sección 5.2, más adelante, también denominadas en esta memoria PDAC (células adherentes derivadas de placenta), por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de dichas células. Los cánceres relacionados con hueso incluyen, sin limitación, mieloma múltiple, cáncer de hueso, neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, cordoma, histiocitoma fibroso maligno de hueso, fibrosarcoma de hueso, cáncer de próstata y cualquier forma de cáncer metastásico caracterizado por metástasis óseas. En el contexto de la invención, el 15 cáncer relacionado con hueso no incluye cáncer de próstata ni mieloma múltiple. En determinadas realizaciones, la administración de células madre placentarias aisladas es terapéuticamente eficaz para reducir, mejorar o invertir uno o más síntomas asociados al cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, un síntoma causado por, asociado o relacionado con, un efecto del cáncer en uno o más huesos en el individuo, por ejemplo, un defecto óseo atribuible al cáncer relacionado con hueso. La administración de células madre placentarias, como se proporciona en esta memoria, a un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, puede producirse antes de, después de, o de manera simultánea con, una segunda terapia contra el cancer, como se analiza a continuación. Por consiguiente, en una realización, los defectos óseos, que son un síntoma de un cáncer relacionado con hueso, se tratan antes de que el cáncer se trate con una segunda terapia antineoplásica. En otra realización, los defectos óseos que son un 20 síntoma de un cáncer relacionado con hueso, se tratan al mismo tiempo, o casi al mismo tiempo, que el cáncer que se trata con una segunda terapia antineoplásica. En otra realización, los defectos óseos, que son un síntoma de un cáncer relacionado con hueso, se tratan después de que el cáncer se trate con una segunda terapia antineoplásica.

25 En un aspecto, en la presente memoria se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en métodos para tratar a un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias. En una realización, en la presente memoria se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias durante un tiempo suficiente para que dichas células madre placentarias mejoren, por ejemplo, mejoren perceptiblemente, uno o más síntomas de dicho cáncer relacionado con hueso, o reduzcan, por ejemplo, reduzcan perceptiblemente, su progresión. En una realización específica, dicho cáncer relacionado con hueso no es mieloma múltiple. En otra realización específica, el cáncer relacionado con hueso es sarcoma. En otras realizaciones específicas, dicho cáncer relacionado con hueso es cáncer de hueso, neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, cordoma, histiocitoma fibroso maligno de hueso o fibrosarcoma de hueso. En otra realización específica, dicho cáncer relacionado con hueso comprende un tumor sólido. En otra realización específica, dicho cáncer 30 relacionado con hueso no es cáncer de próstata.

35 Como se usa en esta memoria, "administrar durante un tiempo suficiente", y similar, incluye, por ejemplo, la administración de células, por ejemplo, una unidad de células, seguido de la evaluación de uno o más síntomas de cáncer relacionado con hueso, durante un tiempo suficiente para determinar cualquier cambio en uno o más síntomas, por ejemplo, en el transcurso de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, o de 1, 2, 3 o 4 semanas, o similar. Si no se detecta ningún cambio, puede tener lugar una o más administraciones posteriores de células.

40 En determinadas realizaciones de la invención, el tratamiento de cánceres relacionados con hueso comprende administrar a un individuo que tenga células de cáncer relacionado con hueso, una cantidad, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz, de células madre placentarias aisladas, en donde al menos algunas de dichas células madre placentarias se ponen directamente en contacto con al menos algunas de las células de cáncer relacionadas con hueso, por ejemplo, hay contacto directo célula-célula entre al menos algunas de dichas células madre placentarias y al menos algunas de dichas células de cáncer relacionado con hueso. En otras realizaciones determinadas, el tratamiento de cánceres relacionados con hueso comprende administrar a un individuo que tiene células de cáncer relacionado con hueso, una cantidad, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz, de 45 células madre placentarias, en donde ninguna, o sustancialmente ninguna, de dichas células madre placentarias, se ponen directamente en contacto con dichas células de cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, no hay, o no hay sustancialmente, contacto directo célula-célula entre gran parte, o ninguna, de dichas células madre placentarias y dichas células relacionadas con cáncer de hueso.

50 En determinadas realizaciones, las células madre placentarias para su uso en la invención, se administran por vía intralesional, por ejemplo, directamente en, o adyacente a (por ejemplo, en aproximadamente 1 -5 cm de) una o más

- lesiones óseas causadas por el cancer relacionado con hueso. En determinadas realizaciones, las células madre placentarias se administran en combinación con una matriz, por ejemplo, una matriz inyectable. En otras realizaciones determinadas, las células madre placentarias se administran a un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, en combinación con alginato, o con plasma rico en plaquetas. En otras realizaciones determinadas, las células madre placentarias se administran a un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, en combinación con una matriz sólida, por ejemplo, un sustituto óseo, una matriz o sustituto óseo descritos más adelante en la Sección 5.7.4.
- En otras realizaciones determinadas, las células madre placentarias se administran por vía intravenosa al individuo. Las células madre placentarias pueden administrarse a un individuo desde cualquier envase, y por cualquier sistema de suministro, médicamente adecuado para el suministro de líquidos, por ejemplo, líquidos que comprenden células. Dichos envases pueden ser, por ejemplo, una bolsa de plástico estéril, un matraz, un frasco, u otro recipiente a partir de cual se puedan dispensar fácilmente las células madre placentarias. Por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico, aceptable desde el punto de vista médico, adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor.
- La administración intralesional o intravenosa puede comprender, por ejemplo, aproximadamente, al menos, o no más de, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , o más, células madre placentarias aisladas en una sola dosis.
- En una realización, la administración intralesional o intravenosa puede comprender aproximadamente 2×10^8 células madre placentarias en una sola dosis. En otra realización, la administración intralesional o intravenosa puede comprender aproximadamente 8×10^8 células madre placentarias en una sola dosis. Las células madre placentarias aisladas pueden administrarse una vez, o más de una vez, durante el transcurso de una terapia. Preferiblemente, las células madre placentarias administradas comprenden al menos el 50% de células viables o más (es decir, al menos aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células madre placentarias en una población de células madre placentarias que son funcionales o viven). Preferiblemente, al menos aproximadamente el 60% de las células en la población son viables. Más preferiblemente, al menos aproximadamente el 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las células en la población en la composición farmacéutica son viables.
- La administración de células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, además de tratar síntomas de cánceres relacionados con hueso, tales como lesiones óseas, puede suprimir la proliferación o el crecimiento de células del cancer relacionado con hueso. La supresión de la proliferación puede incluir, por ejemplo, la reducción del crecimiento o de la tasa de proliferación de las células tumorales, o la muerte de algunas o de todas las células tumorales. Por lo tanto, en otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en un método para suprimir la proliferación de células de un cáncer relacionado con hueso, que comprende poner en contacto dichas células de cáncer relacionado con hueso con una pluralidad de células madre placentarias durante un tiempo suficiente para que dichas células madre placentarias supriman, por ejemplo, supriman de manera perceptible, la proliferación de dichas células de un cáncer relacionado con hueso, en comparación con una pluralidad de dichas células de un cáncer relacionado con hueso que no se pone en contacto con células madre placentarias, por ejemplo, como puede determinarse mediante una reducción perceptible en el número de dichas células después del tratamiento, una reducción perceptible en el aumento en el número de dichas células después del tratamiento, o similar. En realizaciones específicas, dichas células de un cáncer relacionado con hueso son células de cáncer de hueso, células de neuroblastoma, células de osteosarcoma, células de sarcoma de Ewing, células de condrosarcoma, células de cordoma, células de histiocitoma fibroso maligno de hueso, células de un cáncer que metastatiza en el hueso o células de un fibrosarcoma de hueso. En otra realización específica, dichas células de un cáncer relacionado con hueso son células de un tumor sólido o que están en su interior. En otra realización específica, dichas células de un cáncer relacionado con hueso no son células de cáncer de próstata.
- En otra realización específica, dicha puesta en contacto se realiza *in vitro*. En otra realización específica, dicha puesta en contacto se realiza *in vivo*, por ejemplo, mediante la administración de las células a un individuo que tiene células de un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, condrosarcoma. En otra realización específica, dicho individuo es un mamífero. En otra realización específica, dicho individuo es un ser humano. En otra realización específica, dicho contacto comprende administrar dichas células madre placentarias a dicho individuo por vía intravenosa. En otra realización específica, dicho contacto comprende administrar dichas células madre placentarias a dicho individuo en, o adyacente a, una lesión ósea causada por dicho cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, por vía intralesional o intraósea.
- En otra realización, las células madre placentarias aisladas para su uso en un método para suprimir la proliferación de células de un cáncer relacionado con hueso, al poner en contacto dichas células de un cáncer relacionado con hueso con células madre placentarias, comprende además poner en contacto dichas células de un cáncer relacionado con hueso con uno o más compuestos antineoplásicos, por ejemplo, uno o más de los compuestos antineoplásicos indicados en la Sección 5.1.3, por ejemplo, administrando a dicho individuo uno o más de dichos compuestos antineoplásicos.
- En otra realización, la invención comprende administrar al menos 1×10^7 células madre placentarias a dicho individuo, con respecto al número total de células. En otra realización específica la invención comprende administrar

al menos 1×10^8 células madre placentarias a dicho individuo, con respecto al número total de células. En otra realización específica, dichas células madre placentarias han proliferado *in vitro* antes de la administración durante no más de 30 generaciones poblacionales. En otra realización específica, dichas células madre placentarias han proliferado *in vitro* antes de la administración durante no más de 10 generaciones poblacionales. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se han crioconservado y descongelado antes de dicha puesta en contacto.

En otra realización específica de la invención, dichas células madre placentarias suprimen la proliferación de dichas células de un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, por ejemplo, en comparación con la proliferación de un número equivalente de células de un cáncer relacionado con hueso en ausencia de dichas células madre placentarias. En determinadas realizaciones, el porcentaje de reducción en la proliferación puede evaluarse, por ejemplo, comparando una cantidad de células cancerosas relacionadas con el hueso en una muestra tisular (por ejemplo, sangre) de un individuo que tiene el cáncer relacionado con hueso antes y después de la administración de células madre placentarias. En otra realización específica, la invención comprende determinar, antes de dicha puesta en contacto, que dichas células madre placentarias suprimen, por ejemplo, suprimen de manera perceptible, la proliferación de una muestra de dichas células de un cáncer relacionado con hueso. En una realización de este tipo, por ejemplo, las células madre placentarias podrían determinarse para suprimir la proliferación de una muestra de dichas células de un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, tomando una muestra de una población de células madre placentarias (por ejemplo, una muestra de una unidad o lote de un banco de células madre, o similar).

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo, métodos de tratamiento, métodos para suprimir el crecimiento tumoral o métodos para suprimir la maduración de osteoclastos, descritos en la presente memoria, las células madre placentarias, por ejemplo, las PDAC o las BM-MSC, pueden utilizarse en solitario, o las células madre placentarias y las BM-MSC pueden utilizarse en combinación. Cuando se usan en combinación, las células pueden combinarse para poder administrarse al mismo tiempo, por ejemplo, en la misma unidad de células; o pueden administrarse por separado, por ejemplo, mantenidas en unidades celulares distintas, por ejemplo, en bolsas distintas del tipo de bolsas para sangre. Cuando se utilizan en combinación, la administración de las células madre placentarias y de las BM-MSC puede llevarse a cabo conjuntamente, al mismo tiempo, o puede llevarse a cabo en distintos momentos.

Además, en la presente memoria se proporciona el uso de células madre placentarias de la invención en la reducción de la maduración de precursores de osteoclastos en osteoclastos, que comprende poner en contacto dichos precursores de osteoclastos con una pluralidad de células madre placentarias aisladas, en donde dicha pluralidad de células madre placentarias es un número de células madre placentarias suficiente para reducir, p. ej., reducir de forma perceptible, la maduración de osteoclastos a partir de dichos precursores de osteoclastos. En una realización específica, dicha puesta en contacto se produce *in vitro*. En otra realización específica, dicha puesta en contacto se produce *in vivo*. En otra realización específica, dicha puesta en contacto se produce en un mamífero, por ejemplo, en un ser humano.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona el uso de células madre placentarias de la invención en el aumento de la apoptosis de precursores de osteoclastos, que comprende poner en contacto dichos precursores de osteoclastos con una pluralidad de células madre placentaria, en donde dicha pluralidad de células madre placentarias es una cantidad de células madre placentarias suficiente para aumentar, p. ej., aumentar de manera perceptible, la apoptosis de precursores de osteoclastos. En una realización específica, dicho contacto se produce *in vitro*. En otra realización específica, dicho contacto se produce *in vivo*. En otra realización específica, dicho contacto se produce en un ser humano. En otra realización específica, dicho aumento en la apoptosis de precursores de osteoclastos se detecta mediante un aumento perceptible en la tinción con anexina V y con yoduro de propidio de precursores de osteoclastos de dicho individuo.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, las células madre placentarias pueden ser células madre placentarias modificadas mediante ingeniería genética, por ejemplo, las células modificadas mediante ingeniería genética descritas más adelante en la Sección 5.7.2.

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, dicho individuo es un ser humano.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, las BM-MSC pueden ser células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea aisladas, por ejemplo, BM-MSC que se han cultivado o adquirido en una fuente comercial, o pueden ser BM-MSC contenidas en la médula ósea, p. ej., un aspirado de médula ósea, médula ósea ordinaria, o similar.

5.1.1 Tratamiento de mieloma múltiple

En la presente memoria se describen métodos para el tratamiento de un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprenden administrar a dicho individuo células madre placentarias y/o BM-MSC, en donde dichas células madre placentarias aisladas tienen cualquier combinación de las características descritas más adelante en la Sección 5.2., o cualquier combinación de todas ellas.

El mieloma múltiple es un cáncer de células plasmáticas, que son células del sistema inmunitario productoras de anticuerpos. La enfermedad típicamente presenta tres características principales: lesiones óseas, cuyo desarrollo puede provocar osteodinia y elevación del calcio en la sangre; anemia; e insuficiencia renal.

5 En la presente memoria se describen métodos para tratar individuos que tienen una o más enfermedades o afecciones relacionadas con mieloma múltiple, o síntomas de los mismos. Dichas enfermedades o afecciones relacionadas con mieloma múltiple son gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS, *monoclonal gammopathy of unknown significance*), mieloma latente (por ejemplo, mieloma múltiple latente), plasmacitoma solitario, gammapatía monoclonal benigna, gammapatía monoclonal asintomática, gammapatía monoclonal no mielomatosa, gammapatía monoclonal discreta, gammapatía monoclonal criptogénica, gammapatía monoclonal 10 lantánica, gammapatía monoclonal rudimentaria, disimmunoglobulinemia, parainmunoglobulinemia asintomática o paraproteinemia idiopática. En algunos casos, una persona que tiene mieloma latente presenta paraproteína en sangre, pero no presenta otros síntomas de mieloma múltiple.

Por ejemplo, los síntomas son los siguientes.

15 Lesiones óseas y osteodinia (dolor en los huesos): las células de mieloma secretan factor activador de osteoclastos, que es una citocina que activa los osteoclastos para descomponer el hueso, creando lesiones óseas dolorosas. Estas lesiones óseas, visibles, por ejemplo, en las radiografías de rayos X, son de naturaleza lítica y típicamente aparecen como una o más regiones en las que parece faltar hueso o estar "perforado". La osteodinia de mieloma generalmente involucra a la columna vertebral y a las costillas, y empeora con la actividad. Puede haber dolor localizado persistente y puede indicar una fractura ósea patológica. La implicación de las vértebras puede 20 conducir a una compresión de la médula espinal. La descomposición del hueso también conduce a la liberación de calcio en la sangre, lo que conduce a hipercalcemia y a sus síntomas asociados.

Anemia - La anemia que se encuentra en el mieloma suele ser normocítica y normocrómica, y se produce por el reemplazo de médula ósea normal por células tumorales infiltrantes e inhibición de la producción de glóbulos rojos (hematopoyesis) normales por citocinas.

25 Insuficiencia renal - El mieloma múltiple también tiende a producir insuficiencia renal, que puede desarrollarse de manera aguda y crónica. La insuficiencia renal en el mieloma múltiple es atribuible en gran parte a la hipercalcemia, que se desarrolla a medida que los osteoclastos deshacen el hueso existente. La insuficiencia renal también está causada por daño tubular por la excreción de cadenas ligeras, también denominadas proteínas de Bence Jones, que puede manifestarse como el síndrome de Fanconi (acidosis tubular renal tipo II). Otras causas incluyen la deposición 30 glomerular de amiloide, hiperuricemia, infecciones recurrentes (p. ej., pielonefritis) e infiltración local de células tumorales. La insuficiencia renal puede asociarse a niveles elevados de creatinina sérica.

El mieloma múltiple también puede presentarse con otros síntomas, como los indicados a continuación

35 Infección - Otro síntoma común del mieloma múltiple es la infección, ya que el sistema inmunitario está alterado. El aumento del riesgo de infección se debe a la inmunodeficiencia resultante de hipogammaglobulinemia difusa, que se debe a la disminución de la producción y al aumento de la destrucción de anticuerpos normales. Las infecciones más comunes son neumonías y pielonefritis. Los patógenos comunes de neumonía que causan enfermedades en pacientes con mieloma múltiple incluyen *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, mientras que los patógenos comunes que causan pielonefritis incluyen *Escherichia coli*. Típicamente, la infección se produce en los primeros meses después del inicio de la quimioterapia.

40 Síntomas neurológicos - Los síntomas del mieloma múltiple incluyen un espectro de afecciones neurológicas, que incluyen debilidad, confusión y fatiga debido a hipercalcemia, cefalea, cambios visuales y retinopatía, que pueden ser el resultado de hiperviscosidad de la sangre dependiendo de las propiedades de la paraproteína (ver más adelante). Otros síntomas neurológicos incluyen dolor radicular, pérdida del control intestinal o vesical (por ejemplo, debido a la implicación de la médula espinal que conduce a la compresión medular) y síndrome del túnel carpiano y 45 otras neuropatías (por ejemplo, debido a la infiltración de los nervios periféricos por el amiloide). El mieloma múltiple puede dar lugar a paroplejía en los casos de presentación tardía.

50 Presencia de paraproteína - Un síntoma diagnóstico de mieloma múltiple es la presencia en la sangre y/o en la orina de paraproteína, que es una proteína monoclonal (proteína M), por ejemplo, una cadena ligera de inmunoglobulina que se produce por la proliferación clonal de células plasmáticas, o fragmentos de inmunoglobulina. La presencia de paraproteína puede determinarse analizando la proteína de la orina y/o del suero de un individuo mediante electroforesis en gel de agarosa, o mediante inmunofijación utilizando uno o más anticuerpos contra una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina.

55 En determinadas realizaciones, el mieloma múltiple sintomático, se diagnostica cuando se presentan los siguientes síntomas o signos: células plasmáticas clonales que constituyen más del 10% de las células en una biopsia de médula ósea o, en cualquier cantidad en una biopsia de otros tejidos (por ejemplo, plasmacitoma); paraproteína en suero u orina; manifestación de lesión orgánica terminal (relacionada con disfunción orgánica o tisular); por ejemplo, hipercalcemia (por ejemplo, calcio corregido mayor de aproximadamente 12 mg por decilitro de sangre, o mayor de aproximadamente 2,75 mmol en la sangre), insuficiencia renal atribuible a mieloma, anemia definida como

hemoglobina < 10 g/dl en sangre, lesiones óseas (por ejemplo, lesiones líticas u osteoporosis con fracturas por compresión, infecciones graves frecuentes (> 2 al año); amiloidosis (deposición de proteína amiloide) de otros órganos y síndrome de hiperviscosidad (aumento de la viscosidad de la sangre), por ejemplo, una viscosidad de la sangre por encima de 1,8 centipoise, por ejemplo, una viscosidad de la sangre de al menos 2, 3, 4 o 5 centipoise.

5 Las personas que tienen mieloma múltiple, se encuentran en uno de los siguientes grupos. El individuo que tiene mieloma múltiple nunca ha sido tratado para la enfermedad. El individuo tiene mieloma sensible; es decir, mieloma múltiple que responde al tratamiento. Dicho individuo presenta una disminución de proteína M (paraproteína) de al menos 50% como resultado del tratamiento. Como alternativa, el individuo presenta una disminución de proteína M de entre el 25% y el 50% como resultado del tratamiento. El individuo tiene mieloma múltiple estable, que se refiere al mieloma que no ha respondido al tratamiento (por ejemplo, la disminución de la proteína M no ha alcanzado el 50%), pero no ha progresado o empeorado. El individuo tiene mieloma múltiple progresivo, que se refiere al mieloma activo que está empeorando (por ejemplo, aumento de la proteína M y empeoramiento de la disfunción orgánica o tisular o daño orgánico terminal). El individuo ha recidivado el mieloma múltiple, que se refiere a la enfermedad del mieloma que inicialmente respondió a la terapia pero que luego comenzó a progresar nuevamente. En casos específicos, el individuo ha recaído después de la terapia inicial o ha recaído después de la terapia posterior. En otro En realizaciones específicas, el individuo ha recaído después de la terapia inicial o ha recaído después de la terapia posterior. En otro En realizaciones específicas, el individuo ha recaído después de terapia inicial o ha recaído después de terapia posterior. El individuo tiene mieloma múltiple refractario. En un ejemplo específico, el mieloma múltiple refractario es mieloma múltiple que no ha respondido a terapia inicial. En otro ejemplo específico, el mieloma múltiple refractario es mieloma múltiple recidivante que no ha respondido a tratamiento posterior. En otro ejemplo específico, el mieloma múltiple refractario es enfermedad refractaria progresiva que no responde, que se refiere a la enfermedad refractaria que está progresando. En otro ejemplo específico, el mieloma múltiple refractario es enfermedad refractaria no progresiva que no responde, que se refiere a enfermedad refractaria que no empeora.

25 Por lo tanto, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo células madre aisladas placentarias aisladas y/o BM-MSC (por ejemplo, BM-MSC aisladas o BM-MSC en la médula ósea), en donde dicha administración da como resultado la reducción perceptible de la progresión, la disminución perceptible del empeoramiento y / o una mejora perceptible, de uno o más síntomas de mieloma múltiple, por ejemplo, uno o más de los síntomas de mieloma múltiple descritos en la presente memoria, sin limitación. Por ejemplo, dicho uno o más síntomas comprenden sangre o calcio en orina elevados, en comparación con lo normal, la presencia de lesiones óseas, anemia o insuficiencia renal. En otros ejemplos, dichos uno o más síntomas comprenden células plasmáticas, por ejemplo, células plasmáticas clonales que constituyen más del 10% de células en una biopsia de médula ósea o, en cualquier cantidad en una biopsia de otros tejidos (p. ej., Plasmacitoma); paraproteína en suero u orina; y/o evidencia de daño orgánico terminal. En otro ejemplo, dicho uno o más síntomas es una concentración de calcio en la sangre de más de aproximadamente 2,75 mmol/l, insuficiencia renal, menos de aproximadamente 10 g de hemoglobina por decilitro de sangre, la presencia de lesiones óseas o amiloidosis de uno o más órganos distintos de la médula ósea.

40 En otro ejemplo, dicho síntoma es infección, por ejemplo, infección causada por hipergammaglobulinemia. En determinados casos, la infección es neumonía o pielonefritis. En determinados casos, dicha infección se produce al cabo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses después del inicio de la quimioterapia, por ejemplo, quimioterapia para tratar dicho mieloma múltiple.

En otro ejemplo síntoma es un síntoma neurológico. En otros ejemplos, dichos síntomas neurológicos son debilidad, confusión, fatiga, cefalea, cambios visuales, retinopatía, dolor radicular, pérdida del control intestinal o vesical, síndrome del túnel carpiano y / o paraplejía.

45 Adicionalmente, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo células madre placentarias y/o BM-MSC (por ejemplo, BM-MSC aisladas o BM-MSC en médula ósea), en donde dicha administración da como resultado la reducción perceptible en el número de células de mieloma múltiple, por ejemplo, células de mieloma múltiple clonal, en uno o más órganos o tejidos del individuo.

50 Además, en la presente memoria también se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo células madre placentarias y/o BM-MSC aisladas (por ejemplo, BM-MSC aisladas o BM-MSC en médula ósea), en donde dicha administración da como resultado el aumento perceptible en la hemoglobina en la sangre del individuo, por ejemplo, un aumento dentro de los límites normales. Los niveles normales de hemoglobina varían según la edad y el sexo del individuo, como se muestra en la Tabla 1A, a continuación:

55

Tabla 1A

Recién nacidos	17-22 gm/dl
Una (1) semana de vida	15-20 gm/dl
Un (1) mes de vida	11-15 gm/dl
Niños	11-13 gm/dl
Hombres adultos	14-18 gm/dl
Mujeres adultas	12-16 gm/dl
Hombres después de mediana edad	12,4-14,9 gm/dl
Mujeres después de mediana edad	11,7-13,8 gm/dl

5 Por lo tanto, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo, células madre placentarias aisladas y/o BM-MSC (por ejemplo, BM-MSC aisladas o BM-MSC en médula ósea), en donde dicha administración da como resultado el aumento de los niveles de hemoglobina en sangre en dicho individuo a entre 11 g/dl en sangre y 20 g/dl en sangre. Dicha administración puede dar como resultado el aumento de los niveles de hemoglobina en sangre en dicho individuo a entre 11 g/dl en sangre y 13 g/dl en sangre. Dicha administración puede dar como resultado el aumento de los niveles de hemoglobina en sangre en dicho individuo a entre 12 g/dl en sangre y 16 g/dl en sangre. Como alternativa, dicha administración da como resultado el aumento de los niveles de hemoglobina en sangre en dicho individuo a entre 14 g/dl en sangre y 18 g/dl en sangre. Adicionalmente, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene anemia, por ejemplo, que tiene menos de aproximadamente 10 g de hemoglobina por decilitro de sangre, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, en donde dicha anemia es causada por mieloma múltiple y en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para provocar un aumento de la hemoglobina en sangre del individuo hasta aproximadamente 10 gramos por decilitro o más.

10 En la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo células madre placentarias aisladas, una población de células madre placentarias aisladas o una población de células que comprende células madre placentarias aisladas, en donde dicha administración da como resultado una reducción perceptible en el nivel de paraproteína en sangre u orina de dicho individuo. En algunos casos, dicha administración da como resultado la reducción de paraproteína en sangre u orina de dicho individuo a un nivel no perceptible. En otro caso, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene paraproteína en la sangre del individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y/o BM-MSC, en donde la presencia de paraproteína está causada por mieloma múltiple, y en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una reducción perceptible en paraproteína en la sangre del individuo.

15 En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene una cantidad de células plasmáticas clonales mayor del 10%, de todas las células nucleadas, en una biopsia de médula ósea o muestra de sangre de dicho individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y / o BM-MSC, en donde dicho número de células plasmáticas clonales es causado por mieloma múltiple, y en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una reducción perceptible en dicho número de células plasmáticas clonales en una biopsia de médula ósea o muestra de sangre por debajo del 10%.

20 En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene hipercalcemia, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y/o BM-MSC, en donde dicha hipercalcemia está causada por mieloma múltiple, y en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una reducción perceptible de calcio en la sangre del individuo. En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene altos niveles de calcio en la sangre (p. ej., calcio corregido mayor que aproximadamente 12 mg por decilitro de sangre, o mayor que aproximadamente 2,75 mmol), que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y/o BM-MSC, en donde los niveles altos de calcio en la sangre son causados por mieloma múltiple, y en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una reducción perceptible en dichos niveles de calcio en la sangre, p. ej., una reducción en dichos niveles de calcio en la sangre por debajo de aproximadamente 12 mg por litro de sangre, o por debajo de aproximadamente 2,75 mmol.

25 En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene anemia, en donde dicha anemia es causada por mieloma múltiple, en donde dicha anemia se define como hemoglobina en

- 5 sangre de menos de 10 g/dl de sangre, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y/o BM-MSC, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar un aumento perceptible en la hemoglobina en sangre del individuo. Por ejemplo, dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que da como resultado un aumento de la hemoglobina en sangre desde el individuo hasta 10 g/dl o mayor.
- 10 En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene síndrome de hiperviscosidad sanguínea, en donde dicha sangre tiene una viscosidad superior a 1,8 centipoise, en donde dicho síndrome de hiperviscosidad sanguínea está causado por mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y / o BM-MSC, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una disminución perceptible en la viscosidad de la sangre del individuo. En realizaciones específicas, dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que da como resultado una disminución de la viscosidad de la sangre en el individuo por debajo de 5, 4, 3, 2 o 1,8 centipoise.
- 15 En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene un porcentaje de células plasmáticas por encima de, por ejemplo, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% o 20%, en la médula ósea de dicho individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y / o BM-MSC, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una disminución perceptible en el porcentaje de células plasmáticas en la médula ósea del individuo .
- 20 En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo células madre placentarias y / o BM-MSC aisladas (por ejemplo, BM-MSC aisladas o BM-MSC en médula ósea) , en donde dicha administración da como resultado una reducción perceptible en la gravedad y / o el número de lesiones óseas causadas por mieloma múltiple en dicho individuo, como puede determinarse, por ejemplo, mediante exploración ósea o radiografía. En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo células madre placentarias y / o BM-MSC aisladas, en donde dicha administración da como resultado una reducción perceptible de pérdida de masa ósea o contenido mineral óseo, cese de pérdida de masa ósea o contenido mineral óseo, o aumento de la masa ósea o de contenido mineral óseo, en dicho individuo.
- 25 En otro ejemplo del método de tratamiento, dicho uno o más síntomas de mieloma múltiple son osteodinia, lesiones osteocíticas (por ejemplo, visibles por rayos X o resonancia magnética (RM)), osteoporosis, anemia, hipercalcemia o un síntoma debido a hipercalcemia o insuficiencia renal. En algunos casos, dicho individuo nunca ha sido tratado de mieloma múltiple; dicho individuo ha sido tratado de mieloma múltiple y responde a terapia con células madre no placentarias y / o BM-MSC; dicho individuo ha sido tratado de mieloma múltiple y no ha respondido a terapia con células madre no placentarias y / o BM-MSC, pero el curso del mieloma múltiple en dicho individuo no ha progresado; o dicho individuo tiene mieloma múltiple progresivo.
- 30 En algunos casos, la administración de las células madre placentarias y / o BM-MSC (por ejemplo, BM-MSC aisladas o BM-MSC en médula ósea) son suficientes para causar un aumento perceptible en uno o más marcadores de formación ósea en dicho individuo. Por ejemplo, la formación ósea se puede evaluar mediante análisis de niveles de fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP, *bone specific alkaline phosphatase*) y/o péptido N-terminal del procolágeno intacto (PINP, *intact procollagen N-terminal peptide*) de tipo I en suero, por ejemplo, en una muestra de suero de dicho individuo. Un aumento perceptible de BSAP y/o de PINP en suero después de la administración de células madre placentarias y / o BM-MSC a un individuo que tiene mieloma múltiple es un indicativo de un aumento en la formación ósea. Por lo tanto, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo células madre placentarias y / o BM-MSC, en donde dicha administración da como resultado un aumento perceptible de BSAP o PINP en el suero del individuo.
- 35 Por ejemplo, la administración de células madre placentarias y / o BM-MSC aisladas es suficiente para causar una disminución perceptible en uno o más marcadores de reabsorción ósea. Por ejemplo, la reabsorción ósea puede evaluarse mediante el análisis de los niveles de telopéptido C terminal de la cadena de colágeno (CTX) de tipo 1 y/o de la fosfatasa ácidorresistente a tartrato isoforma-5b (TRACP-5b) en suero. Una disminución perceptible en CTX o TRACP-5b después de la administración de células madre placentarias y / o BM-MSC, a un individuo que tiene mieloma múltiple, es un indicativo de una disminución en la reabsorción ósea. Por lo tanto, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo células madre placentarias y / o BM-MSC aisladas (por ejemplo, BM-MSC aisladas o BM-MSC en médula ósea), en donde dicha administración da como resultado una disminución perceptible en CTX o TRACP-5B en el suero del individuo.
- 40
- 45
- 50
- 55 Adicionalmente, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple en fase I, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y / o BM-MSC aisladas (por ejemplo, BM-MSC aisladas o BM-MSC en la médula ósea), en donde dicho mieloma múltiple en fase I se caracteriza por: (i) un nivel de hemoglobina de 10 g/dl o mayor; (ii) hueso normal, o solo 1-2 lesiones, como se observa en un radiograma; (iii) menos de 12 mg/dl de calcio en sangre; y niveles perceptibles de paraproteína; en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dichas células madre placentarias
- 60

y/o BM-MSc es una cantidad suficiente para dar como resultado una mejora de uno o más de dichos síntomas, y/o una reducción perceptible en el número de células plasmáticas en sangre del individuo.

Además, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple en fase II, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y/o BM-MSc aisladas (por ejemplo, BM-MSc aisladas o BM -MSc en médula ósea), en donde dicho mieloma múltiple en fase II se caracteriza por los siguientes síntomas: (i) hemoglobina en sangre por debajo de 8,5 g/dl; (ii) nivel de calcio en sangre por encima de 12 mg/dl; (iii) 3 o más áreas de lesiones óseas como se observa en un radiograma; y (iv) altos niveles de paraproteína; en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dichas células madre placentarias y/o BM-MSc es una cantidad suficiente para dar como resultado una mejoría de uno o más de dichos síntomas, y/o una reducción perceptible en el número de células plasmáticas en la sangre del individuo.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple en fase I, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y / o BM-MSc aisladas (por ejemplo, BM-MSc aisladas o BM-MSc en médula ósea), en donde dicho mieloma múltiple en fase I se caracteriza por microglobulina beta-2 en suero inferior a 3,5 mg /l y un nivel de albúmina sérica de 3,5 g /dl o superior, y en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dichas células madre placentarias y / o BM-MSc es una cantidad suficiente para reducir, p. ej., reducir perceptiblemente, el nivel de beta-2 microglobulina en suero, o aumentar, p. ej., aumentar de manera perceptible, el nivel de albúmina en sangre en dicho individuo.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple en fase II, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y/o BM-MSc aisladas (por ejemplo, BM-MSc aisladas o BM-MSc en médula ósea), en donde dicho mieloma múltiple en fase II se caracteriza por microglobulina beta-2 en suero de entre aproximadamente 3,3 mg /l y 5,5 mg/l con cualquier nivel de albúmina sérica, o un nivel de albúmina sérica por debajo de aproximadamente 3,5 g /dl y microglobulina beta-2 sérica inferior a aproximadamente 3,5 g/l, y en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dichas células madre placentarias y/o BM-MSc es una cantidad suficiente para reducir, por ejemplo, reducir de manera perceptible, el nivel de microglobulina beta-2, por ejemplo, por debajo de aproximadamente 3,3 mg/L, o aumentar, por ejemplo, aumentar de forma perceptible, el nivel de albúmina en sangre, en dicho individuo.

Adicionalmente, en la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple en fase III, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y / o BM-MSc aisladas (por ejemplo, BM-MSc aisladas o BM-MSc en médula ósea), en donde dicho mieloma múltiple en fase III se caracteriza por microglobulina beta-2 en suero mayor de 5,5 mg / l con cualquier nivel de albúmina sérica, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dichas células madre placentarias y / o BM -MSc, es una cantidad suficiente para reducir, por ejemplo, reducir de forma perceptible, la cantidad de microglobulina beta-2 en suero en sangre o suero de dicho individuo, por ejemplo, por debajo de aproximadamente 5,5 mg/l, o por debajo de aproximadamente 3,5 mg/l.

En determinados casos, el individuo que tiene mieloma múltiple es reactivo a una o más terapias de mieloma múltiple celular, por ejemplo, melfalán (con o sin prednisolona), ciclofosfamida (con o sin prednisolona) agentes alquilantes, VAD (vincristina, adriamicina y dosis altas de dexametasona), ABCM (vincristina, adriamicina, prednisolona y carmustina), dosis altas de dexametasona, talidomida, bifosfonatos, etc.

En otros casos, en la presente memoria se describe un método para suprimir la proliferación de células de mieloma múltiple, que comprende poner en contacto dichas células de mieloma múltiple con células madre placentarias aisladas, por ejemplo, las células madre placentarias aisladas descritas más adelante en la Sección 5.2, una población de dichas células madre placentarias aisladas o una población de células que comprende las células madre placentarias aisladas y BM-MSc aisladas o en médula ósea que comprenden BM-MSc, de tal manera que la proliferación de dichas células de mieloma múltiple se suprime, por ejemplo, se suprime de manera perceptible. Adicionalmente, en la presente memoria se describe un método para suprimir la proliferación de células de mieloma múltiple *in vivo*, que comprende administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y/o BM-MSc, que comprende células de mieloma múltiple, en donde dicha administración reduce, por ejemplo, reduce de forma perceptible, la proliferación de dichas células de mieloma múltiple. Por ejemplo, dicha administración reduce, por ejemplo, reduce perceptiblemente (por ejemplo, mejora), uno o más síntomas o signos de mieloma múltiple, o disminuye el empeoramiento de dicho uno o más síntomas o signos de mieloma múltiple. Se puede evaluar una reducción en la proliferación de células de mieloma múltiple después de la administración de células madre placentarias y / o BM-MSc, por ejemplo, detectando una reducción en el número de células plasmáticas de sangre o médula ósea de un individuo que tiene mieloma múltiple, por ejemplo, utilizando uno o más anticuerpos específicos contra células plasmáticas o células de mieloma múltiple, por ejemplo, anticuerpos contra CD28 o CD138.

Adicionalmente, en la presente memoria se describe un método para reducir una cantidad de células de mieloma múltiple, por ejemplo, en un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende poner en contacto dichas células de mieloma múltiple con células madre placentarias y/o BM-MSc aisladas (por ejemplo, BM-MSc aisladas o BM-MSc en médula ósea), de tal manera que el número de células de mieloma múltiple en dicho individuo se suprime,

- p. ej., se suprime de forma perceptible, después de dicha puesta en contacto. Por ejemplo, dicho contacto se realiza mediante la administración de dichas células madre placentarias y/o BM-MSC, a dicho individuo. En otro ejemplo, dicha administración reduce, por ejemplo, reduce perceptiblemente (por ejemplo, mejora), uno o más síntomas o signos de mieloma múltiple, o disminuye el empeoramiento de dicho uno o más síntomas o signos de mieloma múltiple. Una reducción en el número de células de mieloma múltiple después de la administración de células madre placentarias y/o BM-MSC, en comparación con antes de la administración, puede evaluarse, por ej., por detección de una reducción en el número de células plasmáticas de sangre o médula ósea de un individuo que tiene mieloma múltiple, por ej., utilizando uno o más anticuerpos específicos contra células plasmáticas o células de mieloma múltiple, por ejemplo, anticuerpos contra CD28 o CD138.
- 5
- 10 Típicamente, un individuo que presenta uno o más síntomas de mieloma múltiple se evalúa con respecto a mieloma múltiple al menos una vez antes de un diagnóstico final de mieloma múltiple, por ejemplo, como parte de las pruebas realizadas para llegar al diagnóstico de mieloma múltiple. Además, por lo general, un individuo diagnosticado con mieloma múltiple se evalúa al menos una vez, generalmente más de una vez, después de un diagnóstico de mieloma múltiple, para detectar síntomas de mieloma múltiple para medir el progreso de la enfermedad. Dicha
- 15 evaluación puede comprender una determinación de la extensión y / o el número de lesiones óseas utilizando, por ejemplo, análisis de rayos X, resonancia magnética (RM), exploración por tomografía computarizada (TC), exploración por tomografía por emisión de positrones (PET) o similar; una determinación del nivel de calcio en la sangre; una determinación del nivel de proteínas M (anticuerpos o fragmentos de anticuerpos) en la sangre u orina, y similares. La eficacia del tratamiento del mieloma múltiple, p. ej., la eficacia de la administración de células madre placentarias y / o BM-MSC, puede evaluarse por cualquiera de uno o más de dichos síntomas de mieloma múltiple, por ejemplo, mediante la mejora en uno o más, de dichos síntomas de mieloma múltiple. La eficacia también se puede evaluar determinando el número de células de mieloma múltiple en la sangre o médula ósea de dicho individuo, antes y después de la administración de dichas células madre placentarias y / o BM-MSC.
- 20
- 25 Por lo tanto, por ejemplo, cualquiera de los métodos anteriores comprende determinar, una o varias veces antes de dicha administración, y, opcionalmente, una o más veces después de dicha administración, uno o más de (1) un número o grado de lesiones óseas en dicho individuo; (2) un nivel de proteínas M (paraproteína) en sangre u orina del individuo; (3) un nivel de calcio en la sangre del individuo; y / o (4) una serie de células de mieloma múltiple en la sangre o médula ósea del individuo. Si el nivel de calcio en la sangre del individuo, o el nivel de proteínas M en la sangre o la orina del individuo, disminuye, por ejemplo, disminuye de manera perceptible, después de la
- 30 administración de células madre placentarias y/o BM-MSC aisladas, en comparación con el nivel antes de la administración, las células madre placentarias y / o BM-MSC, son terapéuticamente eficaces. De manera similar, en determinados casos, la administración de las células madre placentarias y/o BM-MSC es terapéuticamente eficaz si el número de lesiones óseas, o el grado de gravedad de las lesiones óseas, en el individuo, disminuye después de dicha administración en relación con el número de lesiones óseas, o el grado de gravedad de las lesiones óseas
- 35 antes de dicha administración. En otros casos determinados, la administración de las células madre placentarias y/o BM-MSC también es terapéuticamente eficaz, por ejemplo, si la administración de las células madre placentarias y/o BM-MSC da como resultado una disminución de un aumento en el nivel de proteína M en la sangre u orina del individuo, o la disminución en un aumento en el nivel de calcio en la sangre del individuo, o una disminución en un aumento en el número o gravedad de las lesiones óseas en el individuo. En determinados ejemplos, si no hay cambios perceptibles en el número o la gravedad de las lesiones óseas en el individuo, en el nivel de proteína M en la sangre o la orina del individuo, o en el nivel de calcio en la sangre en el individuo, después de la administración de dichas células madre placentarias y / o BM-MSC, la administración de células madre placentarias, BM-MSC o ambas se repite.
- 40
- 45 La eficacia de la administración de células madre placentarias y / o BM-MSC aisladas también se puede evaluar determinando que una cantidad, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre placentarias y / o BM-MSC reduce, por ejemplo, reduce de manera perceptible, el número de precursores de osteoclastos o células de mieloma múltiple en el individuo después de la administración. La reducción del número de precursores de osteoclastos en dicho individuo puede determinarse mediante cualquier método médicamente aceptable. Por ejemplo, el número de precursores de osteoclastos puede determinarse utilizando un anticuerpo específico para precursores de osteoclastos para detectar precursores de osteoclastos, por ejemplo, en una muestra de sangre periférica o médula ósea del individuo; el número de células marcadas se puede evaluar, por ejemplo, mediante histología, realizando un recuento de células con un microscopio, clasificando células marcadas por citometría de flujo, o similar. En otro ejemplo, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y/o BM-MSC reduce el número de células de mieloma múltiple en dicho individuo, por ejemplo, como puede
- 50 determinarse mediante recuento celular (por ejemplo, mediante citometría de flujo) o tinción de anticuerpos, de células sanguíneas nucleadas de dicho individuo utilizando un anticuerpo específico para células de mieloma múltiple o células plasmáticas, por ejemplo, un anticuerpo específico para marcadores celulares CD28 o CD138.
- 55
- 60 En cualquiera de los métodos de tratamiento de mieloma múltiple, el tratamiento de un síntoma de mieloma múltiple o la supresión de la proliferación de células de mieloma múltiple, como se describe en esta memoria, las células de mieloma múltiple exhiben una translocación de material genético del cromosoma 4 al cromosoma 14 (p. ej., una translocación t(4: 14)). En otros casos, las células de mieloma múltiple exhiben una translocación t(14: 16), una translocación t(11: 14) y / o una reorganización ilegítima de IgH con una pareja cromosómica desconocida. En otros casos determinados, las células de mieloma múltiple no secretan cantidades perceptibles de inmunoglobulina. En

5 otros casos determinados, las células de mieloma múltiple secretan solo, o sustancialmente solo, inmunoglobulina de cadena ligera, por ejemplo, cadena ligera κ (kappa), cadena ligera λ (lambda), o ambas. En otros casos determinados, las células de mieloma múltiple secretan inmunoglobulina que comprende una cadena pesada y una cadena ligera. En otros casos, las células de mieloma múltiple producen inmunoglobulina IgG, inmunoglobulina, IgA o ambas.

10 En cualquiera de los ejemplos anteriores, las células madre placentarias aisladas pueden ser, por ejemplo, las células madre placentarias modificadas mediante ingeniería genética descritas a continuación. En cualquiera de los ejemplos anteriores, las BM-MSC pueden ser BM-MSC modificadas mediante ingeniería genética. Las BM-MSC pueden modificarse mediante ingeniería genética de cualquier manera, como se describe en la ingeniería genética de células madre placentarias, y como se describe más adelante en la Sección 5.7.2.

15 En determinados casos, el individuo que tiene mieloma múltiple se trata adicionalmente con un compuesto quimioterapéutico, por ejemplo, un compuesto antineoplásico descrito en la Sección 5.1.3, a continuación, por ejemplo, uno o más de los compuestos antineoplásicos así como con células madre placentarias y / o BM-MSC. Se pueden administrar células madre placentarias y / o BM-MSC a dicho individuo para tratar el mieloma múltiple, por ejemplo, al mismo tiempo que, o al cabo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses después del inicio de la quimioterapia, p. ej., quimioterapia para tratar dicho mieloma múltiple. En otros casos, el compuesto antineoplásico se administra al cabo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses después de la administración de dichas células madre placentarias y / o BM-MSC.

5.1.2 Tratamiento del condrosarcoma

20 En otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene un condrosarcoma, que comprende administrar a dicho individuo células madre placentarias. Como en cualquier otro lugar de la presente memoria, dichas células madre placentarias aisladas, son como se definen en relación con la invención y además pueden tener cualquier combinación de, o todas, las características descritas más adelante en la Sección 5.2.

25 Por lo tanto, en una realización, en la presente memoria se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene un condrosarcoma, que comprende administrar al individuo las células madre placentarias aisladas, en donde dicha administración da como resultado la reducción perceptible de la progresión, la disminución perceptible del empeoramiento y / o la mejora perceptible de uno o más síntomas de condrosarcoma. En realizaciones específicas, dichos síntomas incluyen, pero sin limitación, osteodinia, una o más lesiones óseas visibles, por ejemplo, en una radiografía, inflamación del hueso, por ejemplo, en el sitio del tumor, o agrandamiento de uno o más huesos.

35 En una realización específica, el condrosarcoma es un condrosarcoma de células claras. En otra realización específica, el condrosarcoma es un condrosarcoma benigno (encondroma). En otra realización específica, el condrosarcoma es un condrosarcoma maligno de grado bajo (condrosarcoma de grado I, caracterizado por tumores que se asemejan al cartílago normal; los tumores pueden rodear áreas de hueso laminar y / o mostrar células atípicas, incluidas las células binucleadas). En otra realización específica, el condrosarcoma es un condrosarcoma maligno de grado intermedio (condrosarcoma de grado II, caracterizado por celularidad significativa con muchas células atípicas, muchas de las cuales tienen hipercromasia (una abundancia de ADN de tinción oscura en el núcleo) y tamaño nuclear aumentado, en comparación al grado I). En otra realización específica, el condrosarcoma es un condrosarcoma maligno de grado alto (condrosarcoma de grado III, caracterizado por áreas marcadas de pleomorfismo, células grandes con hipercromasia significativa, células gigantes ocasionales y abundante necrosis). En otra realización específica, el condrosarcoma es un condrosarcoma desdiferenciado (un condrosarcoma que comprende un tumor de cartílago bien diferenciado (encondroma o condrosarcoma de grado II o II) adyacente a un sarcoma no cartilaginosa de grado alto). En otra realización específica, el condrosarcoma es un condrosarcoma mesenquimal.

45 En determinadas realizaciones, dichas células madre placentarias se administran al individuo sin ningún tratamiento adicional del condrosarcoma. En otras realizaciones determinadas, dichas células madre placentarias se administran al individuo después de cirugía para extirpar parte o todo el tumor de condrosarcoma, o para extirpar parte o todo un hueso afectado por condrosarcoma. En otras realizaciones determinadas, dichas células madre placentarias se administran al individuo antes de la cirugía, o en el momento de la misma, para extirpar parte o todo el tumor de condrosarcoma, o para extirpar parte o todo un hueso afectado por condrosarcoma. En otras realizaciones determinadas, las células madre placentarias se administran al individuo de manera sistémica, por ejemplo, en un sitio o a través de una vía distinta al sitio del condrosarcoma en el individuo; por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, peritoneal o similar. En otras realizaciones determinadas, las células madre placentarias se administran en el sitio del condrosarcoma o adyacente al mismo (si el tumor no se ha extirpado), por ejemplo, en el sitio del condrosarcoma en el individuo, o en el sitio en el cual se extirpó el condrosarcoma, si se hubiera realizado extirpación quirúrgica.

5.1.3 Terapias de combinación

Las células madre placentarias aisladas para su uso en el tratamiento de un cáncer relacionado con hueso, p. ej., condrosarcoma, o de uno de los otros cánceres relacionados con hueso mencionados en la presente memoria, pueden comprender la administración, al individuo que tiene el cáncer, de células madre placentarias en combinación con una segunda terapia. En diversas realizaciones, la segunda terapia se administra al mismo tiempo que dichas células madre placentarias en el mismo ciclo de tratamiento que dichas células placentarias, después de que dichas células madre placentarias se hayan administrado (por ej., después de finalizar un ciclo de tratamiento que comprende administrar células madre placentarias), o antes de la administración de células madre placentarias (por ejemplo, antes del inicio de un ciclo de tratamiento que comprende administrar células madre placentarias). En determinadas realizaciones, las células madre placentarias y la segunda terapia, se formulan conjuntamente para administrarse, por ejemplo, desde el mismo envase o recipiente. En otras realizaciones determinadas, cada una de las células madre placentarias y la segunda terapia, se formulan para administración individual.

Por lo tanto, en otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, condrosarcoma, o uno de los otros cánceres relacionados con hueso enumerados en relación con la invención, que comprende administrar al individuo células madre placentarias aisladas en combinación con una o más terapias antineoplásicas, por ejemplo, una o más quimioterapias o compuestos quimioterapéuticos. Dichas otras terapias antineoplásicas pueden administrarse al individuo al mismo tiempo que dicha administración de células madre placentarias, durante el mismo ciclo de tratamiento que dicha administración de células madre placentarias, o de manera individual a dicha administración de dichas células. En una realización específica, la una o más terapias antineoplásicas se administran secuencialmente con la administración de dichas células madre placentarias. En otra realización específica, dicha otra terapia antineoplásica o terapias antineoplásicas se administran a dicho individuo antes de la administración de dichas células madre placentarias, por ejemplo, al individuo se le administra un ciclo de dichas otras terapias antineoplásicas, y se completa, antes de la administración al individuo de células madre placentarias. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se administran al individuo antes de la administración de dichas otras terapias antineoplásicas; por ejemplo, a dicho individuo se le se administra un ciclo de células madre placentarias antes de la administración de dichas otras terapias antineoplásicas, y finaliza, antes de la administración al individuo de dicha otra terapia antineoplásica o terapias antineoplásicas.

Como se usa en esta memoria, un "agente antineoplásico" o una "terapia antineoplásica" es un agente o una terapia que se ha identificado, por, ej., en estudios clínicos, preclínicos o científicos (incluyendo estudios esporádicos) que tienen un efecto tumoristático o tumoricida sobre uno o más tipos de células tumorales o neoplásicas.

En una realización específica, el agente antineoplásico es melfalán (también conocido como mostaza de L-fenilalanina o L-PAM, nombre comercial Albetan). Por lo tanto, en un ejemplo, un método de tratamiento de un individuo que tiene mieloma múltiple comprende administrar a dicho individuo melfalán, por ejemplo, una dosis o dosis terapéuticamente eficaces de melfalán (por ejemplo, ALKERAN®). La administración es típicamente oral o intravenosa. En otra realización específica, el agente antineoplásico es talidomida. En otra realización específica, el agente antineoplásico es un análogo de talidomida sustituido con amino o un imidazol sustituido con amino. En otra realización específica, el agente antineoplásico es pomalidomida (comercializada con el nombre comercial ACTIMID®); lenalidomida (comercializada con el nombre comercial REVLIMID®); o lenalidomida en combinación con dexametasona. En otra realización específica, el tratamiento antineoplásico es bortezomib (p. ej., VELCADE®). En otra realización específica, el agente antineoplásico comprende una combinación de melfalán, prednisona y talidomida (administrados individual o conjuntamente). En otra realización específica, el agente antineoplásico es la combinación de bortezomib, melfalán y prednisona (administrados individual o conjuntamente). En otras realizaciones específicas, el agente antineoplásico es uno o más de ciclofosfamida (por ejemplo, CYTOXAN®), vincristina (p. ej., ONCOVIN®, VINCASAR PFS®), doxorubicina (por ejemplo, ADRIAMYCIN RDF®, ADRIAMYCIN PFS®) o doxorubicina liposómica (por ejemplo, DOXIL®).

En la técnica se conocen bien otros agentes antineoplásicos. Por lo tanto, en otras realizaciones específicas, los agentes antineoplásicos incluyen, pero sin limitación: acivicina; aclarrubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlin; azacitidina; azetepa; azotomicina; batismat, benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfan; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimero; carboplatino; carmustina; clorhidato de carubicina; carzelesina; cedefingol; celecoxib (inhibidor de COX-2); clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflomitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorrubicina; estramustina; estramustina fosfato de sodio; etanidazol; etopósido; etopósido fosfato; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fludarabina fosfato; fluorouracilo; fluorocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; iroplatino; irinotecán; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de

- megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; peplomicina sulfato; perfosfamida; pipobromano; pipsulfán; 5 clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sodico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sodico; taxotere; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfin; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazoferina; 10 tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; trimetrexato glucuronato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; y clorhidrato de zorrubicina.
- 15 Otros fármacos antineoplásicos incluyen, pero sin limitación: 20-epi-1, 25 dihidroxivitamina D3; 5-etniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelrix; proteína morfogenética 20 antidorsalizante 1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoil estaurosporina; derivados de betalactama; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; 25 bropirimina; budotítán; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; cloruros; cloroquinaxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquona; didemina B; didox; dietilnoespermine; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9- dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxiluridina; doxorubicina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemene; emitefur; eprirubicina; 35 epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; etopósido fosfato; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorrubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotomustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; herregulina; hexametilen bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastat; imatinib (por ejemplo, GLEEVEC®), imiquimod; péptidos inmunoestimuladores; 40 inhibidor del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarin-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptolestatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos lipófilos de platino; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrone; loxoribina; lurtotecán; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteínasa de matriz; menogaril; merbarona; meterelin; metioninasa; metoclopramida; Inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; mitoguazona; niitolactol; análogos de 50 mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos de mitoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; Erbitux, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A + pared celular de micobacterias sk; mopidamol; agente antineoplásico de mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituídas; nafarelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; nitróxido antioxidante; nitrullina; oblimersen (p. ej., GENAENSE®); 0⁶-bencilguanina; octreótido; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilirizoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazelliptina; pegaspargasa; pelesina; pentosan polisulfato sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perillíco; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador de plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero de sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; 60 inmunomodulador basado en proteína A; inhibidor de proteína quinasa C; inhibidores de proteína quinasa C, microalgas; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado piroxilado de hemoglobina polioxiétileno; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón;
- 65

inhibidores de la proteína ras farnesil transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; robitucina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcophytol A; sargramostim; miméticos Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de senescencia; oligonucleótidos en sentido; inhibidores de la transducción de señales; sizofirán; 5 sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; Solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; escualamina; estipiamida; inhibidores de estromelisina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; tallimustina; tamoxifeno metiodida; tauromustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfina; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; 10 trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinan; hormona estimulante del tiroides; estañoetil etiopurpurina; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; Inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado de seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vapreotida; variolina B; velaresol; veramina; 15 verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina estimalamer.

En otras realizaciones, la terapia de combinación comprende la administración de células madre placentarias a un individuo en combinación con un inhibidor de osteoclastos, por ejemplo, un inhibidor de la formación de osteoclastos o de la diferenciación de precursores de osteoclastos en osteoclastos. En una realización específica, el inhibidor de 20 osteoclastos es un inhibidor de RANKL, por ejemplo, Denosumab. En otra realización específica, el inhibidor de osteoclastos es un inhibidor de integrina o catepsina K.

En otra realización, las células madre placentarias para su uso en la invención que comprenden la terapia de combinación comprenden la administración de células madre placentarias en combinación con bifosfonatos. En realizaciones específicas, los bifosfonatos son alendronato (p. ej., a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg al día, o de aproximadamente 35 mg a aproximadamente 70 mg una vez a la semana; con o sin vitamina D complementaria), ibandronato, risedronato, clodronato y/o pamidronato. En otra realización, la 25 terapia de combinación comprende la administración de células madre placentarias en combinación con una o más de calcitonina, estrógeno, hormona paratiroidea (p. ej., teriparatida, por ejemplo, FORTEO®) o raloxifeno.

En otra realización, en la presente memoria se proporcionan células madre placentarias aisladas para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, condrosarcoma, o uno de los otros cánceres relacionados con hueso enumerados en relación con la invención, que comprende administrar al individuo células madre placentarias aisladas en combinación con un compuesto que tiene actividad antagonista de antagonista de activina o de receptor de activina RIIa (ActRIIa), por ejemplo, un antagonista de ActRIIa. En una 30 realización específica, dicho antagonista de ActRIIa es una proteína de fusión IgC-Fc del receptor de activina soluble de tipo IIA (p. ej., ACE-01 1®). Véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2009/0142333.

En otra realización, en la presente memoria se proporcionan células madre placentarias para su uso un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, condrosarcoma o uno de los otros cánceres relacionados con hueso enumerados en relación con la invención, que comprende administrar al individuo células madre placentarias aisladas en combinación con radioterapia. En determinadas realizaciones, la radioterapia 40 comprende administrar rayos X a un órgano o tejido en el individuo que tiene el cáncer relacionado con hueso, que se ve afectado por el cáncer relacionado con hueso. En realizaciones específicas, por ejemplo, dicha radioterapia, por ejemplo, rayos X, se administra a una lesión ósea causada por condrosarcoma. En otras realizaciones específicas, dicha radioterapia, por ejemplo, rayos X, se administra a la mitad del cuerpo del individuo que se ve afectado por dicho cáncer relacionado con hueso. En otras realizaciones específicas, dicha radioterapia, por 45 ejemplo, rayos X, se administra a todo el cuerpo del individuo afectado. En otras realizaciones, dicha radioterapia comprende administrar un haz de protones o un haz de electrones a un órgano o tejido en el individuo que tiene el cáncer relacionado con hueso, que se ve afectado por el cáncer relacionado con hueso. En otras realizaciones determinadas, dicha radioterapia se administra en preparación para la terapia de reemplazo de células madre hematopoyéticas (por ejemplo, radioterapia para destruir el sistema hematopoyético existente en el individuo). 50

En otra realización, las células madre placentarias aisladas para su uso en la invención, se combinan con un sustituto óseo, por ejemplo, para tratar una lesión ósea asociada a un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, mediante administración en, o adyacente a, una lesión ósea causada por un cáncer relacionado con hueso. En una 55 realización específica, dicho sustituto óseo es un material cerámico fisiológicamente aceptable, por ejemplo, fosfato de mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri- y tetra-calcio, hidroxapatita, una fluoroapatita, un sulfato de calcio, un fluoruro de calcio, un óxido de calcio, un carbonato de calcio, un fosfato de calcio - magnesio, un vidrio biológicamente activo (por ejemplo, BIOGLASS®), o una mezcla de cualquiera de los mismos. En otra realización específica, dicho sustituto óseo es un material cerámico biocompatible poroso (por ejemplo, SURGIBONE®, ENDOBON®, CEROS® o similares), o un producto de injerto óseo de colágeno mineralizado (por ejemplo, HEALOS™, VITOSS®, 60 RHAKOSS™ y CORTOSS®, o similares)

5.2 CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

Las células madre placentarias aisladas, útiles en el tratamiento de individuos que tienen un cáncer relacionado con hueso, o que tienen células de un cáncer relacionado con hueso, son células que pueden obtenerse de una placenta o de una parte de la misma, que se adhieren a un sustrato de cultivo tisular (por ejemplo, plástico de cultivo tisular no recubierto), y que tienen características de células madre o células multipotentes. En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos descritos en la presente memoria, tienen la capacidad de diferenciarse en uno o más tipos de células no placentarias. Las células madre placentarias son útiles en los métodos descritos en la presente memoria y que se describen en la presente memoria y, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 7.486.276 y en la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2007/0275362. Las células madre placentarias no son trofoblastos, citotrofoblastos, células germinales embrionarias o células madre embrionarias, células conocidas por los expertos en la materia.

Las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos descritos en la presente memoria, pueden ser de origen fetal o materno (es decir, pueden tener el genotipo del feto o de la madre, respectivamente). Preferiblemente, las células madre placentarias aisladas y las poblaciones de células madre placentarias aisladas son de origen fetal. Las células madre placentarias aisladas o las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas pueden comprender células madre placentarias aisladas que son únicamente de origen fetal o materno o pueden comprender una población mixta de células madre placentarias aisladas de origen tanto fetal como materno. En determinadas realizaciones de cualquiera de las células madre placentarias descritas en esta memoria, dichas células madre placentarias aisladas son de origen no materno. En otras realizaciones determinadas, dichas células madre placentarias carecen sustancialmente de células maternas; p. ej, al menos aproximadamente el 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichas células, son de origen no materno.

Las células madre placentarias aisladas, y las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas, pueden identificarse y seleccionarse por características morfológicas, de marcaje y de cultivo analizadas a continuación. En determinadas realizaciones, cualquiera de las células madre placentarias descritas en esta memoria, son autólogas para un receptor, por ejemplo, para un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso o células de un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, condrosarcoma o células de condrosarcoma u otro cáncer relacionado con hueso o células de otro cáncer relacionado con hueso. En otras realizaciones determinadas, cualquiera de las células madre placentarias descritas en esta memoria, son heterólogas para un receptor, por ejemplo, para un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, o células de un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, condrosarcoma o células de condrosarcoma, u otro cáncer relacionado con hueso o células de otro cáncer relacionado con hueso.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias útiles en los métodos de la invención, por ejemplo, las células madre placentarias descritas en esta memoria, se obtienen de una placenta a término, es decir, de una placenta posparto de mamífero, por ejemplo, de ser humano. En otras realizaciones determinadas, las células madre placentarias útiles en los métodos de la invención, por ejemplo, las células madre placentarias descritas en la presente memoria, se obtienen de una placenta de mamífero pretérmino, por ejemplo, de ser humano.

5.2.1 Características físicas y morfológicas

Cuando las células madre placentarias (PDAC) aisladas descritas en la presente memoria, se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato de cultivo tisular, por ejemplo, a la superficie del recipiente de cultivo tisular (por ejemplo, plástico de cultivo tisular), o a una superficie de cultivo tisular recubierta con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina y proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL® (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)). Las células madre placentarias aisladas en cultivo asumen un aspecto estrellado generalmente fibroblastoide, con una serie de procesos citoplasmáticos que se extienden desde el cuerpo de la célula central. Sin embargo, las células, se distinguen morfológicamente de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que las células madre placentarias aisladas exhiben un mayor número de procesos de este tipo que los fibroblastos. Morfológicamente, las células madre placentarias aisladas también se distinguen de las células madre hematopoyéticas, que generalmente asumen una morfología más redondeada o adoquinada en cultivo, y no se adhieren al plástico de cultivo tisular. Morfológicamente, las células madre placentarias también se distinguen de los trofoblastos o citotrofoblastos, que tienden a aparecer redondeados o epiteloideos y, en el caso de los citotrofoblastos, multinucleados en comparación con las células madre placentarias uninucleadas. Las células madre placentarias son unicelulares y permanecen unicelulares durante el cultivo y durante múltiples pases y no forman, por ejemplo, células multinucleares en cultivo, por ejemplo, en cultivo en medio de crecimiento en aire, o en cultivo en medio de crecimiento con aire 95% / CO₂ 5%.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos de la invención, por ejemplo, los métodos de tratamiento o métodos para suprimir el crecimiento de células cancerosas relacionadas con hueso o suprimir la diferenciación de los precursores de osteoclastos en osteoclastos, cuando se cultivan en un medio de crecimiento, desarrollan cuerpos similares a embriones. Los cuerpos similares a embriones son bien conocidos en la técnica y son grupos no contiguos de células que pueden crecer en la parte superior de una capa de proliferación adherente de células madre placentarias aisladas. La expresión "similar a un embrión" se utiliza porque los grupos de células se asemejan a cuerpos embrionarios, grupos de células que crecen de cultivos de células

madre embrionarias. El medio de crecimiento en donde pueden desarrollarse cuerpos similares a embriones que pueden desarrollarse en un cultivo en proliferación de células madre placentarias aisladas incluye medio que comprende, por ejemplo, DMEM-LG (por ejemplo, de Gibco); suero bovino fetal al 2% (p. ej., de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona 10^{-9} M (p. ej., de Sigma); ácido 2-fosfato ascórbico 10^{-4} M (p. ej., de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems).

5.2.2 Marcadores de superficie celular, moleculares y genéticos

Las células madre placentarias aisladas son células madre placentarias humanas adherentes a plástico de cultivo tisular que tienen características de células multipotentes o células madre, y expresan una pluralidad de marcadores que se pueden utilizar para identificar y / o aislar las células, o poblaciones de células que comprenden las células madre. Las células madre placentarias aisladas incluyen células y poblaciones de células que contienen células madre placentarias obtenidas directamente de la placenta, o de una parte de la misma. Las poblaciones de células madre placentarias aisladas también incluyen poblaciones (es decir, dos o más) de células madre placentarias aisladas en cultivo, y una población en un recipiente, por ejemplo, una bolsa. Las células madre placentarias aisladas en la presente memoria descritas no son células mesenquimatosas derivadas de médula ósea, células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo o células mesenquimatosas obtenidas de sangre de cordón umbilical, sangre placentaria o sangre periférica. Las células madre placentarias útiles en los métodos y composiciones descritos en esta memoria se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 7,311,904; 7,311,905; y 7,468,276; y en la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2007/0275362. En una realización específica de cualquiera de las realizaciones de las células madre placentarias descritas en esta memoria, las células son células de mamífero, por ejemplo, de ser humano.

Según la invención, las células madre placentarias aisladas son células madre placentarias aisladas. Específicamente, las células placentarias aisladas son células multipotentes placentarias aisladas. Según la invención, las células madre placentarias aisladas son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo. Tal como se usa en esta memoria, la frase "como puede detectarse por", "como puede determinarse por" y frases similares, no indica que la expresión de los marcadores indicados de las células tenga que evaluarse para que las células se "aislen", ni que las células deban aislarse utilizando los marcadores. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo neuronal, células de un fenotipo osteogénico y / o células de un fenotipo condrogénico, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, o ambas cosas. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas de CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD200⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ aisladas son adicionalmente CD45⁻ o CD90⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ aisladas son adicionalmente CD45⁻ y CD90⁺, como puede detectarse mediante citometría de flujo. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ aisladas son adicionalmente CD90⁺ o CD45⁻, como puede detectarse por citometría de flujo. En una realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ son adicionalmente una o más de CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD166⁺, KDR⁺ o CD133⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ aisladas son adicionalmente CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD166⁺, KDR⁺ y CD133⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ aisladas son adicionalmente CD90⁺ y CD45⁻, como puede detectarse mediante citometría de flujo, es decir, las células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ son además, CD44⁺, CD80⁻ y / o CD86⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente una o más de CD80⁻, CD86⁻, CD117⁻, CD133⁻, citoqueratina⁺, KDR⁺, HLA-A, B, C⁺, HLA-DR, DP, DQ- y HLA-G⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son, además, una o más de SSEA1⁻, SSEA3⁻ y/o SSEA4⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente SSEA1⁻, SSEA3⁻ y SSEA4⁻.

En otra realización específica, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y una o más de CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD166⁺, KDR⁻ o CD133⁻. En una realización más específica, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD166⁺, KDR⁻ y CD133⁻. En otra realización, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y una o más de HLA ABC⁺, HLA DR, DQ, DP⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD98⁻ o PD-L1⁺. En una realización específica, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, HLA ABC⁺, HLA DR, DQ, DP⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD98⁻, y PD-L1⁺. En determinadas realizaciones, dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y una o más de CD3⁻, CD9⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD133⁻, HLA-DR, DP, DQ⁻, SSEA3⁻, SSEA4⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, HLA-A, B, C⁺, PDL1⁺, ABC-p⁺, y/u OCT-4⁺, como puede detectarse mediante citometría de flujo. En otras realizaciones, cualquiera de las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ descritas anteriormente, son adicionalmente una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias son adicionalmente CD44⁺. En otra realización específica de cualquiera de las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas anteriores, las células son adicionalmente una o más de CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2), HLA-A, B, C⁺, HLA-DP, DQ, DR⁻, o Ligando 1 de muerte programada

(PDL1)⁺, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas son adicionalmente una o más de CD3⁻, CD9⁻, CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-caderina^{baja}, CD146⁺, CD166⁺, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, o Ligando 1 de muerte programada (PDL1)⁺, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización, las células madre placentarias CD3⁻, CD9⁻, CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-caderina^{baja}, CD146⁺, CD166⁺, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, y Ligando 1 de muerte programada (PDL1)⁺.

En otra realización específica, cualquiera de las células madre placentarias aisladas descritas en esta memoria son ABC-p⁺, como puede detectarse por citometría de flujo y/u OCT-4⁺ (POU5F1⁺), como puede determinarse mediante RT-PCR, en donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)), y OCT-4 es la proteína Octamer-4 (POU5F1). En otra realización específica, cualquiera de las células madre placentarias descritas en esta memoria son adicionalmente SSEA3- o SSEA4-, como puede detectarse por citometría de flujo, en donde SSEA3 es el antígeno 3 específico de fase embrionaria, y SSEA4 es el antígeno 4 específico de fase embrionaria. En otra realización específica, cualquiera de las células madre placentarias descritas en esta memoria son, además, SSEA3- y SSEA4-.

En otra realización específica, cualquiera de las células madre placentarias descritas en esta memoria son una o más de MHC-I+ (por ejemplo, HLA-A, B, C⁺), MHC-II (por ejemplo, HLA-DP, DQ, DR-) o HLA-G-. En otra realización específica, cualquiera de las células madre placentarias descritas en esta memoria son una o más de MHC-I⁺ (por ejemplo, HLA-A, B, C⁺) MHC-II (por ejemplo, HLA-DP, DQ, DR- y HLA-G-).

En la presente memoria también se proporcionan poblaciones de células que comprenden, por ejemplo, que están enriquecidas con, las células madre placentarias aisladas, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Las poblaciones preferidas de células comprenden las células madre placentarias aisladas, en donde al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de las células en dicha población de células son células madre placentarias CD10⁺, CD105⁺ y CD34⁻ aisladas. En una realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas son adicionalmente CD200⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas son adicionalmente CD90⁺ o CD45⁻, como puede detectarse por citometría de flujo. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas son adicionalmente CD90⁺ y CD45⁻, como puede detectarse por citometría de flujo. En otra realización específica, cualquiera de las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas, descritas anteriormente, son adicionalmente una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas son adicionalmente CD44⁺. En una realización específica de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺ aisladas anteriores, las células madre placentarias son adicionalmente una o más de CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-caderina^{baja}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR, HLA-G⁻, o Ligando 1 de muerte programada (PDL1)⁺, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-caderina^{baja}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, y Ligando 1 de muerte programada (PDL1)⁺.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, y una o más, o todas de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺ y ABC-p⁺, en donde dichas células madre placentarias aisladas se obtienen por alteración física y/o enzimática del tejido placentario. En una realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente OCT-4⁺ y ABC-p⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente OCT-4⁺ y CD34⁻, en donde dichas células madre placentarias aisladas tienen al menos CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, y una, o todas, las siguientes características: CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻. En otra realización específica las células madre placentarias aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra realización, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente OCT-4⁺ y CD34⁻, y son SH2⁺ o SH3⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente OCT-4⁺, CD34⁻, SH2⁺ y SH3⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻ y SSEA4⁻, y cualquiera de SH2⁺ o SH3⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente OCT-4⁺ y CD34⁻, y

cualquiera de SH2⁺ o SH3⁺, y es al menos una de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻, o SSEA4⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente OCT-4⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻, y cualquiera de SH2⁺ o SH3⁺.

5 En otra realización, las células madre placentarias aisladas útiles en los modos y composiciones descritos en la presente memoria son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, y adicionalmente SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son CD10⁺ CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, y adicionalmente CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, CD34⁻, CD45⁻, SSEA3⁻ o SSEA4⁻. En otra realización, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻ CD10⁺, CD29⁺,
10 CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, OCT-4⁺, CD34⁻ o CD45⁻.

En otra realización, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la memoria son CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, y adicionalmente CD29⁺ CD34⁻, CD44⁺ CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺. SH2⁺, SH3⁺, y SH4⁺; en donde dichas células madre placentarias aisladas son adicionalmente una o más de OCT-4⁺, SSEA3⁻ o SSEA4⁻.

15 En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son adicionalmente HLA-G⁻. En una realización específica, las células madre placentarias aisladas son CD200⁺ y HLA-G⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son
20 adicionalmente CD34⁻ CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas CD200⁺ y HLA-G⁻ facilitan la formación de cuerpos similares a embriones en una población de células placentarias que comprenden las células madre placentarias aisladas en condiciones que permiten la formación de cuerpos similares a embriones. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas se aíslan de células placentarias que no son células madre o multipotentes. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se aíslan de células placentarias que no presentan a estos marcadores.
25

En otra realización, una población de células útil en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una población de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida con células madre placentarias CD200⁺, HLA-G⁻. En una realización específica, dicha población es una población de células placentarias. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 % de células en dicha población de células son células madre placentarias CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas. En determinadas realizaciones, al menos aproximadamente el 70 % de las células en dicha población de células son células madre placentarias CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas. En otras realizaciones determinadas, al menos aproximadamente el 90 %, 95 %, o 99 % de dichas células son células madre placentarias CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas. En una realización específica de las poblaciones de células, dichas células madre placentarias CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas también son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas también son CD34⁻ y adicionalmente CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas también son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células placentarias que no son células madre. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas se aíslan de células placentarias que no presentan estos marcadores.
30
35
40

En otra realización, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son CD73⁺, CD105⁺, y CD200⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente HLA-G⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son CD34⁻ y adicionalmente CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son CD34⁻, CD38⁻ CD45⁻, y HLA-G⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas están aisladas de células placentarias que no son las células madre placentarias aisladas. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas se aíslan de células placentarias que no presentan estos marcadores.
45
50

En otra realización, una población de células útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, por ejemplo, que es rica en células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 % de las células en dicha población de células son células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células en dicha población de células son células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente el 90 %, 95 % o 99 % de las células en dicha población de células son células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas. En una realización específica de dichas poblaciones, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente HLA-G⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente CD34⁻ y adicionalmente CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, las
55
60

células madre placentarias aisladas son adicionalmente CD34⁺, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ y HLA-G⁻. En otra realización específica, dicha población de células madre placentarias está aislada de células placentarias que no son células madre. En otra realización específica, dicha población de células madre placentarias está aislada de células placentarias que no presentan estas características.

5 En otras realizaciones determinadas, las células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, y una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, HLA-G⁻ o ABC-p⁺ aisladas. En una realización específica, las células madre placentarias son CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, y una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, y OCT-4⁺ aisladas. En otra realización específica, las células madre placentarias son CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, y una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, y SH4⁺ aisladas. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, y una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, HLA-G⁻, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias son adicionalmente OCT-4⁺ y ABC-p⁺ aisladas. En otra realización específica, las células madre placentarias son adicionalmente SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻ aisladas. En una realización específica, dichas células madre placentarias OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻ aisladas son adicionalmente CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, y SH4⁺. En otra realización, las células madre placentarias adicionalmente OCT-4⁺ y CD34⁻ y cualquiera de SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización, las células madre placentarias aisladas son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ y cualquiera de CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺ u OCT-4⁺.

25 En otra realización, las células madre placentarias útiles de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son CD200⁺ y OCT-4⁺. En una realización específica, las células madre placentarias son CD73⁺ y CD105⁺ aisladas. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas son adicionalmente HLA-G⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son CD34⁻ y adicionalmente CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas están aisladas lejos de células de la placenta que no son células madre. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas, están aisladas de células placentarias que no presentan estas características.

35 En otra realización, una población de células útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida con, células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 % de células en dicha población de células son células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente el 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % de las células en dicha población de células son dichas células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas. En una realización específica de las poblaciones aisladas, dichas células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente HLA-G⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻. En otra realización específica, dicha población de células está aislada de células placentarias que no son células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas. En otra realización específica, dicha población de células está aislada de células placentarias que no presentan estos marcadores.

50 En otra realización, las células madre placentarias útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas son CD34⁻ y adicionalmente CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, las células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son adicionalmente OCT-4⁺. En otra realización específica, células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son CD200⁺. En otra realización específica, células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son CD34⁻, CD200⁺, y adicionalmente CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas están aisladas de células madre placentarias que no son células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas están aisladas de células placentarias que no presentan estos marcadores.

60 En otra realización, una población de células útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, por ejemplo, que es rica en células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el

20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 % de las células en dicha población de células son células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente el 70% de las células en dicha población de células son células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente el 90 %, 95 % o 99 % de las células en dicha población de células son células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas también son CD34⁻ y adicionalmente CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son adicionalmente OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas también son CD200⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas también son CD34⁻, CD10⁺, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra realización específica, dicha población de células está aislada de células placentarias que no son células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻. En otra realización específica, dicha población de células está aislada de células placentarias que no presentan estos marcadores.

En otra realización, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, HLA-A,B,C⁺, CD45⁻ y CD133⁻ aisladas. En otra realización, una población de células útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende células madre placentarias aisladas, en donde al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 99 % de las células en dicha población de células aisladas son células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ y CD34⁻ aisladas. En una realización específica, dichas células madre placentarias o población de células madre placentarias aisladas están aisladas de células placentarias que no son células madre placentarias HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ y CD34⁻. En otra realización específica de cualquiera de las células madre placentarias descritas en la presente memoria, dichas células madre placentarias no son de origen materno. En otra realización específica, dicha población aislada de células madre placentarias carece sustancialmente de componentes maternos, por ejemplo, al menos aproximadamente el 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichas células en dicha población aislada de células placentarias no son de origen materno.

En otra realización, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻ aisladas. En otra realización, una población de células útil en los medios y composiciones descritas en el presente documento es una población de células que comprende dichas células madre placentarias aisladas, en donde al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 99 % de células en dicha población de células son dichas células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻ aisladas. En una realización específica, dichas células madre placentarias aisladas o población de células madre placentarias aisladas están aisladas de células placentarias que no son dichas células placentarias aisladas. En otra realización específica, dichas células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻ aisladas no son de origen materno, es decir, tienen el genotipo fetal. En otra realización específica, al menos aproximadamente el 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichas células en dicha población de células madre placentarias aisladas, no son de origen materno. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas o población de células madre placentarias aisladas están aisladas de células placentarias que no presentan estas características.

En algunos casos, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son células madre placentarias CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻ y CD117⁻ aisladas. En otro caso, una población de células útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, por ejemplo, esta enriquecida con, dichas células madre placentarias aisladas, en donde al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 99 % de células en dicha población de células son células madre placentarias CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, y CD117⁻ aisladas. En un ejemplo, dichas células madre placentarias aisladas o población de células madre placentarias aisladas están aisladas de células placentarias que no son dichas células madre placentarias. En otro ejemplo, dichas células madre placentarias aisladas no son de origen materno. En otro ejemplo al menos aproximadamente el 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichas células madre placentarias en dicha población de células son de origen no materno. En otro ejemplo dichas células madre placentarias aisladas o población de células madre placentarias aisladas están aisladas de células placentarias que no presentan estos marcadores.

En otro caso, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son células madre placentarias CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻ y CD117⁻ aisladas. En un ejemplo, una población de células útil para los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, por ejemplo, está enriquecida con células madre placentarias CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻ aisladas, en donde al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 99 % de las células

5 en dicha población son células madre placentarias CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻. Un ejemplo específico, dichas células madre placentarias aisladas o población de células madre placentarias aisladas están aisladas de células placentarias que no son células madre placentarias. En otro ejemplo, dichas células madre placentarias aisladas no son de origen materno. En otro ejemplo, al menos aproximadamente el 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichas células en dicha población de células son de origen no materno. En otro ejemplo, dichas células madre placentarias aisladas o población de células madre placentarias aisladas están aisladas de células placentarias que no presentan estas características.

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

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

30 En otra realización, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, y una o más de CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-caderina^{baja}, CD184/CXCR4⁻, β2 microglobulina^{baja}, MHC-I^{baja}, MHC-II⁻, HLA-G^{baja}, y/o PDLI^{baja}. En una realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente al menos CD29⁺ y CD54⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente al menos CD44⁺ y CD106⁺. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas son adicionalmente al menos CD29⁺.

35 En otra realización, una población de células útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria comprenden células madre placentarias aisladas en donde al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células en dicha población de células son células madre placentarias aisladas que son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, y una o más de CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-caderina^{dim}, CD184/CXCR4⁻, β2-microglobulina^{dim}, HLA-I^{dim}, HLA-II⁻, HLA-G^{dim}, y/o PDLI^{dim}. En otra realización específica, al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de células en dicha población son CD10⁺ CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-caderina^{dim}, CD184/CXCR4⁻, β2-microglobulina^{dim}, MHC-I^{dim}, MHC-II⁻, HLA-G^{dim}, y PDLI^{dim}.

40 En otra realización, las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritas en la presente memoria son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, y una o más, o todas de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3- SSEA4⁺, OCT-4⁺, y ABC-p⁺, en donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)), en donde dichas células madre placentarias aisladas se obtienen por perfusión de una placenta de mamífero, por ejemplo, una placenta humana, cuya sangre umbilical se ha drenado y perfundido para eliminar sangre residual.

45 En otra realización específica de cualquiera de las realizaciones de células madre placentarias descritas en la presente memoria, las células son negativas para la expresión del gen de la telomerasa, negativas para la actividad telomerasa o ambas cosas. La expresión del gen de la telomerasa puede detectarse utilizando, por ejemplo, detección de ARN telomerasa utilizando, por ejemplo, transferencias puntuales o transferencias en ranura; o un ensayo de protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas (ensayo TRAP) (por ejemplo, kits de ensayo

TRAPEZE® ELISA, fluorométricos o basados en gel de Millipore).

5 En otra realización específica de cualquiera de las realizaciones de células madre placentarias descritas en esta memoria, las células madre placentarias son positivas para vimentina, por ejemplo, al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 98% de dichas células madre placentarias expresan vimentina. La vimentina se puede detectar, por ejemplo, mediante citometría de flujo utilizando uno o más anticuerpos contra vimentina, por ejemplo, los anticuerpos disponibles en Abcam; mediante tinción con fluorescencia *in situ*, o técnicas similares.

10 En otra realización específica de cualquiera de las realizaciones de células madre placentarias descritas en esta memoria, las células madre placentarias no secretan cantidades perceptibles de gonadotropina coriónica humana (hCG), que puede detectarse, por ejemplo, mediante ensayo ELISA o de inmunofluorescencia utilizando, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal HCG1 contra hCG (Abeam) o los anticuerpos policlonales anti-hCG (Abcam, Novus Biologicals).

15 En otra realización de cualquiera de las células madre placentarias aisladas descritas en esta memoria, una población de células madre placentarias aisladas comprende células placentarias CD56⁺ adherentes a plástico de cultivo tisular que no son linfocitos citotóxicos naturales. En una realización específica, la población comprende de aproximadamente 1% a aproximadamente 30% de dichas células placentarias CD56⁺ en dicha población de células madre placentarias aisladas, como puede determinarse mediante citometría de flujo utilizando CD56 marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína). En otra realización específica, la población comprende de aproximadamente 20 16% a aproximadamente 62% de dichas células placentarias CD56⁺ en dicha población de células madre placentarias aisladas, como puede determinarse mediante citometría de flujo utilizando CD56 marcado con APC (aloficocianina).

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

25 El perfil genético confirma que las células madre placentarias aisladas se pueden distinguir de otras células, por ejemplo, de células madre mesenquimatosas, por ejemplo, de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea. Las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria se pueden distinguir, por ejemplo, de células madre mesenquimatosas basándose en la expresión de uno o más genes, cuya expresión es significativamente mayor en las células madre placentarias aisladas, o en determinadas células madre de cordón umbilical aisladas, en comparación con las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea. En particular, las células madre placentarias aisladas, útiles en los métodos de tratamiento proporcionados en esta memoria, se pueden distinguir de las células madre mesenquimatosas, por ejemplo, de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, basándose en la expresión de uno o más genes, cuya expresión es significativamente mayor (es decir, al menos dos veces mayor) en las células madre placentarias aisladas que en un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, en donde el uno o más genes son ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, ILIA, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A, o una combinación de cualquiera de los anteriores, cuando las células se cultivan en condiciones equivalentes. Véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2007/0275362. En determinadas realizaciones específicas, dicha expresión de dicho uno o más genes más se determina, por ejemplo, mediante RT-PCR o análisis de micromatrices, por ejemplo, utilizando una micromatriz U133-A (Affymetrix). En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas expresan dicho uno o más genes cuando se cultivan durante un número de generaciones poblacionales, por ejemplo, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 35 generaciones poblacionales, en un medio que comprende DMEM-LG (por ejemplo, de Gibco); suero bovino fetal al 2% (p. ej., De Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona 10⁻⁸ M (p. ej., de Sigma); ácido ascórbico 2-fosfato 10⁻⁴ M (por ejemplo, de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems). En otra realización específica, el gen específico de célula madre placentaria aislada es CD200. Debe entenderse que, en general, la expresión de un gen particular, por ejemplo, cualquiera de los genes enumerados en esta memoria, se evalúa mediante el análisis de la expresión agregada del gen en una población de células madre placentarias.

55 Se pueden encontrar secuencias específicas para estos genes en GenBank, por ejemplo, con los números de referencia NM_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), (NM_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM_001845 (COL4A1), NM_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758 (DMD), AF293359 (DSC3), NM_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM_018215 (FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (ILIA), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG) BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NM_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM_014476 (PDLIM3), BC126199

(PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160 o BC065328 (SLC12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN) y BC005001 (ZC3H12A) desde marzo de 2008.

5 En determinadas realizaciones específicas, cada una de dichas células madre placentarias aisladas expresa ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1 A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A a un nivel superior, por ejemplo, a un nivel perceptiblemente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, cuando las células se cultivan en condiciones equivalentes.

10 En realizaciones específicas, las células madre placentarias expresan CD200 y ARTS1 (regulador de aminopeptidasa del factor de necrosis tumoral de tipo 1); CD200 y NUA1, ARTS-1 y LRAP (arginina aminopeptidasa derivada de leucocitos); IL6 (interleuquina-6) y TGFB2 (factor de crecimiento transformante, beta 2); IL6 y KRT18 (queratina 18); IER3 (respuesta temprana inmediata 3), MEST (homólogo del transcrito específico del mesodermo) y TGFB2; CD200 e IER3; CD200 e IL6; CD200 y KRT18; CD200 y LRAP; CD200 y MEST; CD200 y NFE2L3 (factor nuclear (derivado de eritroide 2) - similar al 3); o CD200 y TGFB2 a un nivel superior, por ejemplo, a un nivel perceptiblemente más alto, que un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (BM-MS) en donde que dichas células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea han experimentado una serie de pases en cultivo equivalente al número de pases que han experimentado dichas células madre placentarias aisladas. En otras realizaciones específicas, las células madre placentarias expresan ARTS-1, CD200, IL6 y LRAP; ARTS-1, IL6, TGFB2, IER3, KRT18 y MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 y TGFB2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 y TGFB2; o IER3, MEST y TGFB2 a un nivel superior, por ejemplo, a un nivel perceptiblemente más alto, que un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea BM-MS, en donde dichas células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea han experimentado una serie de pases en cultivo equivalente al número de pases que han experimentado las células madre placentarias aisladas.

20 La expresión, por ejemplo, la expresión diferencial comparada con la de las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, de los genes referenciados anteriormente se puede evaluar mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, mediante técnicas convencionales pueden seleccionarse y construirse individualmente sondas basadas en la secuencia del(los) gen(es). La expresión de los genes se puede evaluar, por ejemplo, en una micromatriz que comprende sondas para uno o más de los genes, por ejemplo, una matriz GENECHIP® Human Genome U133A 2.0 de Affymetrix, o una matriz GENECHIP® Human Genome U133 Plus 2.0 de Affymetrix (Santa Clara, California). La expresión de estos genes se puede evaluar incluso si se modifica la secuencia de un número de registro de GenBank en particular, ya que utilizando técnicas convencionales bien conocidas pueden generarse fácilmente sondas específicas para la secuencia modificada.

30 El nivel de expresión de estos genes puede utilizarse para confirmar la identidad de una población de células madre placentarias aisladas, para identificar una población de células que comprende al menos una pluralidad de células madre placentarias aisladas, o similar. Las poblaciones de células madre placentarias aisladas, cuya identidad se confirma, pueden ser clonales, por ejemplo, poblaciones de células madre placentarias aisladas expandidas a partir de una sola célula madre placentaria aislada, o una población mixta de células madre, por ejemplo, una población de células que comprende células madre placentarias aisladas que se expanden desde múltiples células madre placentarias aisladas, o una población de células que comprende células madre placentarias aisladas, como se describe en esta memoria, y al menos otro tipo de células.

40 El nivel de expresión de estos genes se puede utilizar para seleccionar poblaciones de células madre placentarias aisladas. Por ejemplo, una población de células madre placentarias, por ejemplo, células madre placentarias expandidas clonalmente, puede seleccionarse si la expresión de uno o más de los genes enumerados anteriormente es significativamente mayor en una muestra de la población de células madre placentarias que en una población equivalente de células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

50 Las células madre placentarias aisladas se pueden seleccionar basándose en el nivel de expresión de uno o más de dichos genes en comparación con el nivel de expresión en dichos uno o más genes, por ejemplo, en un control de células madre mesenquimatosas, por ejemplo, el nivel de expresión en dichos uno o más genes en un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea. En una realización, como control, se utiliza el nivel de expresión de dichos uno o más genes en una muestra que comprende un número equivalente de células madre mesenquimatosas. En otra realización, el control, para células madre placentarias aisladas ensayadas en determinadas condiciones, es un valor numérico que representa el nivel de expresión de dichos uno o más genes en células madre mesenquimatosas en dichas condiciones.

60 En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria muestran las características anteriores (por ejemplo, combinaciones de marcadores de superficie celular y/o perfiles de expresión génica) en cultivo primario, o durante la proliferación en medio que comprende, por ejemplo, DMEM-LG

(Gibco), suero bovino fetal al 2% (p. ej., De Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona 10^{-9} M (p. ej., de Sigma); ácido ascórbico 2-fosfato 10^{-4} M (por ejemplo, de Sigma); factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml (R & D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (R & D Systems) y penicilina 100 U / Estreptomina 1000 U.

- 5 En determinadas realizaciones de cualquiera de las células madre placentarias descritas en esta memoria, las células son humanas. En determinadas realizaciones de cualquiera de las células madre placentarias descritas en esta memoria, las características del marcador celular o las características de expresión génica son marcadores humanos o genes humanos.

- 10 En otra realización específica de dichas células madre placentarias aisladas o poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas, dichas células madre placentarias o poblaciones se han expandido, por ejemplo, se han realizado pases al menos, aproximadamente, o no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces, o han proliferado durante al menos, aproximadamente, o no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 generaciones poblacionales. En otra realización específica de dichas células madre placentarias aisladas o poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas, dichas células o poblaciones son aislados primarios. En otra realización específica de las células madre placentarias aisladas, o poblaciones de células que comprenden células madre placentarias aisladas, descritas en esta memoria, dichas células madre placentarias aisladas son de origen fetal (es decir, tienen el genotipo fetal).

- 20 En determinadas realizaciones, dichas células madre placentarias aisladas no se diferencian durante el cultivo en medio de crecimiento, es decir, medio formulado para promover la proliferación, por ejemplo, durante la proliferación en medio de crecimiento. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas no requieren una capa alimentadora para proliferar. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas no se diferencian en cultivo en ausencia de una capa alimentadora, únicamente debido a la falta de una capa alimentadora de células.

- 25 En otra realización, las células útiles en los métodos y composiciones descritos en esta memoria, son células madre placentarias aisladas, en donde una pluralidad de dichas células madre placentarias aisladas son positivas para la aldehído deshidrogenasa (ALDH), según se evalúa mediante un análisis de actividad de aldehído deshidrogenasa. Dichos ensayos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bostian y Betts, Biochem. J., 173, 787, (1978)). En una realización específica, dicho ensayo ALDH utiliza ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregón) como un marcador de actividad aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, dicha pluralidad es entre aproximadamente 3% y aproximadamente 25% de células en dicha población de células. En otra realización, en la presente memoria se proporciona una población de células de cordón umbilical aisladas, por ejemplo, células de cordón umbilical aisladas multipotentes, en donde una pluralidad de dichas células de cordón umbilical aisladas son positivas para la aldehído deshidrogenasa, según se evalúa mediante un análisis de actividad de aldehído deshidrogenasa que utiliza ALDEFLUOR® como un indicador de actividad aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, dicha pluralidad es entre aproximadamente 3% y aproximadamente 25% de células en dicha población de células. En otra realización, dicha población de células madre placentarias aisladas o células madre de cordón umbilical aisladas, muestran al menos tres veces, o al menos cinco veces, mayor actividad ALDH si se compara con una población de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea que tiene aproximadamente el mismo número de células y se cultivan en las mismas condiciones.

- 45 En una realización específica de cualquiera de las realizaciones anteriores de las células madre placentarias útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria, las células madre placentarias expresan uno cualquiera, o cualquier combinación de, los marcadores de citometría de flujo y/o marcadores de expresión génica descritos en esta memoria. En determinadas realizaciones, al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 98% de las células madre placentarias en una población aislada de las células madre placentarias aislada descritas en la presente memoria, expresan uno cualquiera, o cualquier combinación de, los marcadores de citometría de flujo y/o marcadores de expresión génica descritos en esta memoria.

- 50 En determinadas realizaciones de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria, las células madre placentarias en dichas poblaciones de células, carecen sustancialmente de células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o el 99% de las células madre placentarias en dicha población tienen un genotipo fetal. En otras realizaciones determinadas de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria, las poblaciones de células que comprenden dichas células madre placentarias carecen sustancialmente de células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o el 99% de las células en dicha población tienen un genotipo fetal.

- 60 En una realización específica de cualquiera de las células madre placentarias aisladas o poblaciones celulares de células madre placentarias aisladas anteriores, el cariotipo de las células, o al menos aproximadamente el 95% o aproximadamente el 99% de las células en dicha población, es normal. En otra realización específica de cualquiera de las células madre placentarias anteriores, las células madre placentarias, o las células en la población de células,

son de origen no materno.

Las diferentes poblaciones de células madre placentarias aisladas que llevan cualquiera de las combinaciones de marcadores anteriores, pueden combinarse en cualquier proporción. Se pueden combinar dos o más poblaciones de las células madre placentarias aisladas anteriores para formar una población de células madre placentarias aisladas. Por ejemplo, una población de células madre placentarias aisladas puede comprender una primera población de células madre placentarias aisladas, definida por una de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente, y una segunda población de células madre placentarias aisladas, definida por otra de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente, en donde dichas primera y segunda poblaciones se combinan en una proporción de aproximadamente 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, o aproximadamente, 99: 1. De manera similar, puede combinarse cualquiera de tres, cuatro, cinco o más poblaciones de las células madre placentarias aisladas descritas anteriormente.

Se pueden obtener células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, por ejemplo, por alteración del tejido placentario, con o sin digestión enzimática (véase la Sección 5.3.3) o perfusión (véase la Sección 5.3.4). Por ejemplo, pueden producirse poblaciones de células placentarias aisladas, a partir de las cuales se pueden aislar células madre placentarias, según un método que comprende perfundir una placenta de mamífero cuya sangre de cordón umbilical se ha drenado y perfundido para eliminar la sangre residual; perfundir dicha placenta con una solución de perfusión; y recoger dicha solución de perfusión, en donde después de la perfusión dicha solución de perfusión comprende una población de células placentarias que comprende células madre placentarias aisladas; y aislar una pluralidad de dichas células placentarias aisladas de dicha población de células. En una realización específica, la solución de perfusión se hace pasar a través de la vena umbilical y las arterias umbilicales y se recoge después de exudarse de la placenta. En otra realización específica, la solución de perfusión se hace pasar a través de la vena umbilical y se recoge de las arterias umbilicales, o se hace pasar a través de las arterias umbilicales y se recoge de la vena umbilical

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

Otra realización específica, proporcionada en la presente memoria, es una composición que comprende una población de células madre placentarias aisladas, tal como se describe en la presente memoria, recogida por perfusión, en donde dicha composición comprende al menos una porción de la solución de perfusión utilizada para recoger las células madre placentarias aisladas.

Las células madre placentarias descritas en la presente memoria también pueden aislarse por digestión del tejido placentario con una o más enzimas que alteran el tejido, para obtener una población de células placentarias que comprende las células madre placentarias y aislar, o aislar sustancialmente, las células madre placentarias del resto de dichas células placentarias. Toda la placenta, o parte de la misma, puede digerirse para obtener las células madre placentarias aisladas que se describen en la presente memoria. En otra realización específica, la enzima que altera el tejido es tripsina o colagenasa. En diversas realizaciones, las células madre placentarias aisladas, contenidas en una población de células obtenida de la digestión de una placenta, son al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos el 99,5% de dicha población de células placentarias.

Las poblaciones de las células madre placentarias aisladas descritas anteriormente pueden comprender aproximadamente, al menos, o no más de, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más de las células madre placentarias aisladas. Las poblaciones de células madre placentarias aisladas útiles en los métodos de tratamiento descritos en esta memoria comprenden al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de células madre placentarias aisladas viables, por ejemplo, como puede determinarse, por ejemplo, por exclusión con azul de tripano.

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

5.2.3 Crecimiento en cultivo

En determinadas realizaciones, el crecimiento de las células madre placentarias aisladas descritas en la presente

memoria en la Sección 5.2.2, depende en parte del medio particular seleccionado para el crecimiento. En condiciones óptimas, las células madre placentarias aisladas típicamente duplican su número en aproximadamente 1-3 días. Durante el cultivo, las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria se adhieren a un sustrato en cultivo, por ejemplo, a la superficie de un recipiente de cultivo tisular (por ejemplo, plástico de placa de cultivo tisular, plástico recubierto de fibronectina, y similar) y forman una monocapa. En realizaciones específicas, dichas células madre placentarias duplicadas en cultivo cuando se cultivan a 37 °C en aire al 95%/CO₂ al 5% en medio que comprende DMEM-LG al 60% (Gibco) y MCDB-201 al 40% (Sigma) complementado con suero bovino fetal (FCS) al 2% (Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona 10⁹ M (Sigma); ácido ascórbico 2- fosfato 10⁻⁴ M (Sigma); factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml (R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (R & D Systems) y penicilina 100 U/estreptomicina 1000 U; o en medio que comprende DMEM-LG (Gibco) complementado con suero bovino fetal (FCS) al 2%-10% (Hyclone Labs.); 1x ITS; 1x (LA-BSA); dexametasona 10⁻⁹ M (Sigma); ácido ascórbico 2- fosfato 10⁻⁴ M (Sigma); factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml (R & D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (R & D Systems) y penicilina 100 U/ estreptomicina 1000 U.

5.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS AISLADAS

5.3.1 Composición para la recogida de células

Las células madre placentarias se obtienen de una placenta de mamífero utilizando una solución fisiológicamente aceptable, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2007/0190042 se describe con detalle una composición para la recogida de células.

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

La composición para la recogida de células puede comprender uno o más componentes que tienden a conservar las células madre placentarias aisladas, es decir, a impedir que las células madre placentarias aisladas se mueran, o a retrasar la muerte de las células madre placentarias aisladas, a reducir el número de células madre placentarias aisladas en una población de células que se muere, o similares, desde el momento de la recogida hasta el cultivo. Dichos componentes pueden ser, por ejemplo, un inhibidor de la apoptosis (p. ej., un inhibidor de caspasa o un inhibidor de JNK); un vasodilatador (p. ej., sulfato de magnesio, un fármaco antihipertensivo, un péptido natriurético auricular (ANP), una hormona liberadora de corticotropina, adrenocorticotrópica, nitroprusiato sódico, hidralazina, trifosfato de adenosina, adenosina, indometacina o sulfato de magnesio, un inhibidor de fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de la necrosis (por ejemplo, 2- (1H-Indol-3-il) -3-pentilamino-maleimida, pirrolidina ditiocarbamato de clonazepam); un inhibidor de TNF- α ; y/o un perfluorocarbono transportador de oxígeno (p. ej., bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

La composición para la recogida de células puede comprender una o más enzimas degradadoras de tejido, por ejemplo, una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una RNasa o una DNasa o similares. Dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, colagenasas (p. ej., colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, liberasa, hialuronidasa y similares.

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

La composición para la recogida de células también puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM); iones de magnesio (de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); una macromolécula de peso molecular mayor de 20,000 daltons, en una realización, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad endotelial y la viabilidad celular (p. ej., un coloide sintético o de origen natural, un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (p. ej., hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presente de aproximadamente 25 μ M a aproximadamente 100 μ M); un agente reductor (por ejemplo, N-acetilcisteína presente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que impide la entrada de calcio en las células (p. ej., verapamilo presente de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 25 μ M); nitroglicerina (por ejemplo, de aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 0,2 g/l); un anticoagulante, en una realización, presente en una cantidad suficiente para ayudar a impedir la coagulación de

sangre residual (por ejemplo, heparina o hirudina presente a una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (por ejemplo, amilorida, etil isopropil amilorida, hexametilén amilorida, dimetil amilorida o isobutil amilorida presente de a aproximadamente 1,0 µM a aproximadamente 5 µM).

5 **5.3.2 Recogida y manipulación de la placenta**

En general, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento. En una realización preferida, la placenta se recupera de un paciente después de dar su consentimiento informado y después de realizar un historial médico completo del paciente y que se asocia a la placenta. Preferiblemente, el historial médico continúa después del parto. Dicho historial médico se puede utilizar para coordinar el uso posterior de la placenta o de las células madre placentarias aisladas recogidas de la misma. Por ejemplo, a la luz del historial clínico, se pueden utilizar células madre placentarias humanas aisladas, para medicamentos personalizados para el bebé asociado a la placenta, o para los padres, hermanos u otros parientes del bebé.

Antes de la recuperación de las células madre placentarias aisladas, la sangre del cordón umbilical y de la placenta se eliminan preferiblemente. En determinadas realizaciones, después del parto, se recupera la sangre del cordón umbilical en la placenta. La placenta puede someterse a un proceso de recuperación de sangre de cordón convencional. Típicamente, se utiliza una aguja o una cánula, con la ayuda de la gravedad, para extraer sangre de la placenta (véase, por ejemplo, Anderson, Patente de Estados Unidos N° 5.372.581; Hessel et al., Patente de Estados Unidos N° 5.415.665). La aguja o cánula se coloca generalmente en la vena umbilical y la placenta se puede masajear suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón umbilical de la placenta. Dicha recuperación de sangre del cordón umbilical se puede realizar comercialmente, por ejemplo, LifeBank USA, Cedar Knolls, NJ. Preferiblemente, la placenta se drena por gravedad sin más manipulación para minimizar la alteración del tejido durante la recuperación de la sangre del cordón umbilical.

Típicamente, una placenta se transporta desde la sala de parto o nacimiento a otro lugar, p. ej., a un laboratorio, para la recuperación de la sangre de cordón umbilical y la recogida de células madre placentarias, p. ej., por perfusión o disociación tisular. La placenta se transporta preferiblemente en un dispositivo de transporte estéril, térmicamente aislado (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28 °C), por ejemplo, colocando la placenta con el cordón umbilical proximal sujeto, en una bolsa de plástico estéril con cierre de cremallera, que después se coloca en un envase aislado. En otra realización, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre de cordón sustancialmente como se describe en la patente en trámite de Estados Unidos N° 7, 147.626. Preferiblemente, la placenta se envía al laboratorio a las cuatro a veinticuatro horas después del parto. En determinadas realizaciones, el cordón umbilical proximal se sujeta, preferiblemente dentro de 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de la sangre del cordón umbilical. En otras realizaciones, el cordón umbilical proximal se sujeta después de la recuperación de la sangre del cordón umbilical, pero antes del procesamiento posterior de la placenta.

La placenta, antes de la recogida de células, se puede conservar en condiciones estériles y a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 °C a 25 °C. La placenta puede conservarse durante un período de cuatro a veinticuatro horas, hasta cuarenta y ocho horas, o más de cuarenta y ocho horas, antes de perfundir la placenta para eliminar cualquier resto de sangre del cordón umbilical. En una realización, la placenta se recoge entre aproximadamente las cero horas y aproximadamente dos horas después de la expulsión. La placenta se conserva preferiblemente en una solución anticoagulante a una temperatura de 5 °C a 25 °C. Las soluciones anticoagulantes adecuadas son muy 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 (por ejemplo, 1% p/p en solución 1: 1000). La placenta sin sangre se conserva preferiblemente durante no más de 36 horas antes de recoger las células madre de la placenta.

La placenta mamaria, o una parte de la misma, una vez recogida y preparada en general como se indica anteriormente, se puede tratar de cualquier manera conocida en la técnica, por ejemplo, se puede perfundir o alterar, por ejemplo, digerir con una o más enzimas que alteran el tejido, para obtener células madre placentarias aisladas.

5.3.3 Alteración física y digestión enzimática del tejido placentario

En una realización, las células madre se recogen de una placenta de mamífero mediante alteración física de parte de todo el órgano. Por ejemplo, la placenta, o una porción de la misma, puede, por ejemplo, triturarse, cortarse, picarse, cortarse en cubitos, cortarse en trozos pequeños, macerarse o similar. El tejido puede después cultivarse para obtener una población de células madre placentarias aisladas. Típicamente, el tejido placentario se altera utilizando, p. ej., medio de cultivo, una solución salina o una composición para la recogida de células madre (véase la Sección 5.5.1, más adelante).

Típicamente, alterando un pequeño bloque de tejido placentario, por ejemplo, un bloque de tejido placentario que tiene un volumen de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o de aproximadamente 1000 milímetros cúbicos, pueden obtenerse células madre placentarias aisladas. Se puede utilizar cualquier método de alteración física, siempre que el método de alteración

deje una pluralidad, más preferiblemente una mayoría, y más preferiblemente al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicho órgano viable, como puede determinarse, por ejemplo, mediante exclusión con azul de tripano.

5 Generalmente, las células madre placentarias aisladas pueden recogerse de una placenta, o de una porción de la misma, en cualquier momento al cabo de aproximadamente los tres primeros días después de la expulsión, pero preferiblemente entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 18 horas después de la expulsión.

En una realización específica, el tejido alterado se cultiva en medio de cultivo tisular adecuado para la proliferación de células madre placentarias aisladas (véase, por ejemplo, la Sección 5.6, a continuación, que describe el cultivo de células madre placentarias, por ejemplo, PDAC).

10 En otra realización específica, las células madre placentarias se aíslan, por ejemplo, en parte, por alteración física del tejido placentario, en donde la alteración física incluye digestión enzimática, que puede realizarse utilizando una o más enzimas digestivas de tejido. La placenta, o una parte de la misma, también puede alterarse físicamente y digerirse con una o más enzimas, y el material resultante se sumerge después, o se mezcla, en una composición para la recogida de células.

15 Una composición preferida para la recogida de células, comprende una o más enzimas alteradoras de tejido. Como enzimas que pueden utilizarse para alterar el tejido de la placenta se incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina, colagenasa, dispasa o elastasa. Las serina proteasas pueden inhibirse por alfa 2 microglobulina en suero y, por lo tanto, el medio utilizado para la digestión generalmente no contiene suero. El EDTA y la DNasa se usan comúnmente en procedimientos de digestión de enzimas para aumentar la
20 eficiencia de la recuperación celular. El material digerido se diluye preferiblemente para impedir el atrapamiento de células dentro del hidrolizado viscoso.

Se puede utilizar cualquier combinación de enzimas de digestión tisular. Las concentraciones típicas para la digestión utilizando tripsina incluyen, de 0,1% a aproximadamente 2% de tripsina, por ejemplo, aproximadamente 0,25% de tripsina. Las proteasas pueden utilizarse en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma
25 reacción de digestión, o se pueden utilizar secuencialmente para liberar las células madre placentarias. Por ejemplo, en una realización, una placenta, o parte de la misma, se digiere primero con una cantidad apropiada de colagenasa I de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 mg/ml durante, por ejemplo, 30 minutos, seguido de digestión con tripsina, a una concentración de aproximadamente 0,25%, durante, por ejemplo, 10 minutos, a 37 ° C. Las serina proteasas se utilizan preferiblemente de manera consecutiva después de utilizar otras enzimas.

30 En otra realización, el tejido puede alterarse además añadiendo un quelante, por ejemplo, ácido etilenglicol bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), a la composición para la recogida de células madre, que comprende las células madre, o a una solución en donde el tejido está alterado y/o se ha digerido antes del aislamiento de las células madre placentarias con la composición para la recogida de células madre.

35 Después de la digestión, el material digerido se lava, por ejemplo, tres veces, con medio de cultivo, y las células lavadas se siembran en matraces de cultivo. Las células se aíslan después por adherencia diferencial y se caracterizan, por ejemplo, con respecto a su viabilidad, marcadores de superficie celular, diferenciación y similares.

Se apreciará que, cuando una placenta entera, o una porción de una placenta, que comprende células tanto fetales como maternas (por ejemplo, donde la porción de la placenta comprende el corión o los cotiledones), las células madre placentarias aisladas pueden comprender una mezcla de células madre placentarias derivadas de fuentes tanto fetales como maternas. Cuando una parte de la placenta no comprende, o comprende un número despreciable, de células maternas (por ejemplo, amnios), las células madre placentarias aisladas de la misma, comprenderán casi exclusivamente células madre placentarias fetales (es decir, células madre placentarias que tienen el genotipo del feto)

45 Las células madre placentarias, p. ej., las células madre placentarias descritas anteriormente en la Sección 5.2.2, pueden aislarse de tejido placentario alterado por digestión diferencial con tripsina (véase la Sección 5.3.5, más adelante) seguido de cultivo en uno o más envases de cultivo nuevos en medio de proliferación reciente, seguido opcionalmente de una segunda etapa de digestión diferencial con tripsina.

5.3.4 Perfusión placentaria

50 Las células madre placentarias, por ejemplo, las células madre placentarias descritas en la Sección 5.2.2, anterior, también pueden aislarse, por ejemplo, en parte, por perfusión de la placenta mamaria. Se describen métodos para perfundir la placenta de mamífero para obtener células madre placentarias, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 7.045.148 y 7.255.729, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N°. 2007/0275362 y 2007/0190042.

55

- Las células madre placentarias pueden recogerse, por ejemplo, aislarse, por perfusión, por ejemplo, a través de la vasculatura placentaria, utilizando, por ejemplo, como solución de perfusión, una composición para la recogida de células. En una realización, una placenta de mamífero se perfunde haciendo pasar una solución de perfusión a través de cualquiera de la arteria umbilical y vena umbilical o a través de ambas. El flujo de la solución de perfusión a través de la placenta puede realizarse utilizando, por ejemplo, flujo de gravedad en la placenta. Preferiblemente, la solución de perfusión se hace pasar a través de la placenta utilizando una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica. La vena umbilical puede, por ejemplo, canularse con una cánula, por ejemplo, una cánula de TEFLON® o de plástico, que está conectada a un aparato de conexión estéril, como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión.
- En preparación para la perfusión, la placenta se orienta preferentemente (p. ej., se suspende) de tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical se encuentran en el punto más alto de la placenta. La placenta se puede perfundir haciendo pasar un líquido de perfusión a través de la vasculatura placentaria y el tejido circundante. La placenta también puede perfundirse haciendo pasar un líquido de perfusión a la vena umbilical y recogiendo de las arterias umbilicales, o haciendo pasar un líquido de perfusión a las arterias umbilicales y recogiendo de la vena umbilical.
- En una realización, por ejemplo, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente, por ejemplo, a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un depósito de la solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa a la vena y a la arteria umbilical. La solución de perfusión se exuda desde y/o atraviesa las paredes de los vasos sanguíneos al interior de los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un recipiente abierto adecuado desde la superficie de la placenta que estaba adherida al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también se puede introducir a través de la abertura del cordón umbilical y se deja que fluya o se filtre fuera de las aberturas en la pared de la placenta que se interconectó con la pared uterina materna. Las células madre placentarias que se recogen mediante este método, que puede denominarse método de "barrido" (*pan*), son típicamente una mezcla células fetales y maternas.
- En otra realización, la solución de perfusión se hace pasar a través de las venas umbilicales y se recoge desde la arteria umbilical, o se hace pasar a través de la arteria umbilical y se recoge desde las venas umbilicales. Las células madre placentarias recogidas por este método, que se puede denominar método de "circuito cerrado", son típicamente casi exclusivamente fetales.
- Se apreciará que la perfusión utilizando el método de barrido, es decir, mediante el cual se recoge el perfundido después de que haya exudado del lado materno de la placenta, da como resultado una mezcla de células fetales y maternas. Como resultado, las células recogidas mediante este método pueden comprender una población mixta de células madre placentarias de origen tanto fetal como materno. Por el contrario, la perfusión únicamente a través de la vasculatura placentaria en el método de circuito cerrado, mediante el cual el líquido de perfusión se hace pasar a través de uno o dos vasos placentarios y se recoge únicamente a través del (los) vaso (s) restante (s), da como resultado la recogida de una población de células madre placentarias casi exclusivamente de origen fetal.
- En una realización, el método de perfusión de circuito cerrado puede realizarse de la siguiente manera. Se obtiene una placenta posparto aproximadamente 48 horas después del nacimiento. El cordón umbilical se pinza y se corta por encima de la pinza. El cordón umbilical puede descartarse, o puede procesarse para recuperar, p. ej., células madre de cordón umbilical, y/o procesar la membrana del cordón umbilical para la producción de un biomaterial. La membrana amniótica se puede retener durante la perfusión o se puede separar del corion, por ejemplo, utilizando una disección roma con los dedos, si la membrana amniótica se separa del corion antes de la perfusión, esta se puede, por ejemplo, descartar o procesar, por ejemplo, para obtener células madre mediante digestión enzimática, o para producir, por ejemplo, un biomaterial de membrana amniótica, por ejemplo, el biomaterial descrito en la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos N° 2004/0048796. Después de retirar de la placenta todos los coágulos de sangre visibles y la sangre residual, utilizando, por ejemplo, una gasa estéril, los vasos del cordón umbilical se exponen, por ejemplo, cortando parcialmente la membrana del cordón umbilical para exponer una sección transversal del cordón. Los vasos se identifican y se abren, por ejemplo, haciendo avanzar una pinza de cocodrilo cerrada a través del extremo cortado de cada vaso. El aparato, por ejemplo, un tubo de plástico conectado a un dispositivo de perfusión o bomba peristáltica, se inserta después en cada una de las arterias placentarias. La bomba puede ser cualquier bomba adecuada para este fin, por ejemplo, una bomba peristáltica. El tubo de plástico, conectado a un depósito de recogida estéril, por ejemplo, una bolsa de sangre, tal como una bolsa de recogida de 250 ml, se inserta después en la vena placentaria. Alternativamente, el tubo conectado a la bomba se inserta en la vena placentaria y se insertan tubos en uno o más depósitos de recogida en una o ambas arterias placentarias. Después, la placenta se perfunde con un volumen de solución de perfusión, por ejemplo, una solución de perfusión de aproximadamente 750 ml. Después, las células del perfundido se recogen, por ejemplo, por centrifugación. En determinadas realizaciones, la placenta se perfunde con solución de perfusión, por ejemplo, con una solución de perfusión de 100-300 ml, para eliminar la sangre residual antes de la perfusión para recoger las células madre placentarias. En otra realización, la placenta no se perfunde con solución de perfusión para eliminar la sangre residual antes de la perfusión para recoger las células madre placentarias.
- En una realización, el cordón umbilical proximal se sujeta durante la perfusión, y más preferiblemente, se sujeta a una distancia de 4-5 cm (centímetros) de la inserción del cordón en el disco placentario.

La primera recogida de líquido de perfusión de una placenta de mamífero durante el proceso de desangrado generalmente se tiñe con glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón umbilical y/o de la placenta. El líquido de perfusión se vuelve más incoloro a medida que avanza la perfusión y los glóbulos rojos residuales del cordón se retiran por lavado de la placenta. Generalmente para desangrar inicialmente la placenta, es adecuado un líquido de perfusión de 30 a 100 ml (mililitros), pero dependiendo de los resultados observados puede utilizarse más o menos líquido de perfusión.

El volumen del líquido de perfusión utilizado para aislar células madre placentarias puede variar dependiendo del número de células a recoger, del tamaño de la placenta, del número de recogidas a realizar a partir de una sola placenta, etc. En varias realizaciones, el volumen del líquido de perfusión puede ser de 50 ml a 5000 ml, de 50 ml a 4000 ml, de 50 ml a 3000 ml, de 100 ml a 2000 ml, de 250 ml a 2000 ml, de 500 ml a 2000 ml o de 750 ml a 2000 ml. Típicamente, la placenta se perfunde con 700-800 ml de líquido de perfusión después del desangrado.

La placenta puede perfundirse varias veces en el transcurso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se va a perfundir varias veces, se puede mantener o cultivar en condiciones asépticas en un recipiente u otro recipiente adecuado, y se puede perfundir con la composición de recogida celular, o con una solución de perfusión convencional (por ejemplo, una solución salina normal, tal como como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (p. ej., heparina, warfarina sódica, cumarina, bishidroxocumarina) y/o con o sin un agente antimicrobiano (p. ej., β -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos como estreptomina (por ejemplo, a 40-100 μ g/ml), penicilina (por ejemplo, a 40U/ml), anfotericina B (por ejemplo, a 0,5 μ g/ml). En una realización, una placenta aislada se conserva o se cultiva durante un período de tiempo sin recoger el perfundido, de modo que la placenta se conserva o se cultiva durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o durante 2 o 3 o más días antes de la perfusión y la recogida del perfundido. La placenta perfundida puede conservarse durante una o más veces adicionales, por ejemplo, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más horas, y perfundirse por segunda vez, por ejemplo, con 700-800 ml de líquido de perfusión. La placenta se puede perfundir 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En una realización preferida, la perfusión de la placenta y la recogida de la solución de perfusión, por ejemplo, la composición de la recogida de células, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas disminuya por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos en diferentes momentos pueden procesarse adicionalmente de manera individual para recuperar poblaciones de células dependientes del tiempo, por ejemplo, células madre. Los perfundidos de diferentes momentos también pueden agruparse. En una realización preferida, se recogen células madre placentarias a la vez o entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 18 horas después de la expulsión.

Las células madre placentarias se pueden aislar de la placenta por perfusión con una solución que comprende una o más proteasas u otras enzimas que alteran el tejido. En una realización específica, una placenta, o parte de la misma (p. ej., membrana amniótica, amnios y corion, lóbulo placentario o cotiledón, cordón umbilical o combinación de cualquiera de los anteriores), se lleva a 25-37 °C y se incuba durante 30 minutos con una o más enzimas que alteran el tejido en 200 ml de un medio de cultivo. Las células del perfundido se recogen, se llevan a 4°C y se lavan con una mezcla enfriada de inhibidores que comprende EDTA 5 mM, ditiotreitól 2 mM y beta-mercaptoetanol 2 mM. Las células madre placentarias se lavan después de varios minutos con una composición enfriada (p. ej., a 4 °C) para la recogida de células madre.

En determinadas realizaciones, la perfusión (ya sea por el método de barrido como por el método de circuito cerrado) se realiza, por ejemplo, en una bandeja, bajo una campana estéril abierta. En otras realizaciones determinadas, la perfusión se realiza en un recinto cerrado, por ejemplo, en una bolsa estéril que contiene la placenta. En otras realizaciones determinadas, la placenta se pliega, por ejemplo, se pliega por la mitad, o sustancialmente por la mitad, una o varias veces durante la perfusión. En realizaciones específicas, el plegamiento se realiza a mano, o mecánicamente.

La perfusión, llevada a cabo como se describe anteriormente, da como resultado la recogida de un perfundido placentario, una solución que comprende una población heterogénea de diferentes células placentarias, cuya población comprende las células madre placentarias adhesivas a plástico de cultivo tisular, descritas anteriormente en la Sección 5.2.2, así como células madre placentarias hematopoyéticas, p. ej., células madre placentarias CD34⁺, que no son adherentes a plástico de cultivo tisular.

5.3.5 Aislamiento, clasificación y caracterización de células madre placentarias

Las células madre placentarias aisladas, por ejemplo, las células adherentes a plástico de cultivo tisular descritas en la Sección 5.2.2, anterior, ya sea obtenidas por perfusión o alteración física, por ejemplo, por digestión enzimática, pueden purificarse inicialmente (es decir, aislarse de) otras células mediante centrifugación en gradiente Ficoll. Dicha centrifugación puede seguir cualquier protocolo convencional de velocidad de centrifugación, etc. En una realización, por ejemplo, las células recogidas de la placenta se recuperan del perfundido mediante centrifugación a 5000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente, que separa las células, por ejemplo, de residuos contaminantes y plaquetas. En determinadas realizaciones, el Ficoll se utiliza a una densidad de aproximadamente 1,070 g/ml a aproximadamente 1,090 g/ml, por ejemplo, de aproximadamente 1,073 g/ml, 1,077 g/ml o de aproximadamente 1,084 g/ml; las células madre placentarias se recogerán en la parte superior del gradiente

a estas densidades. En otra realización, el perfundido placentario se concentra a aproximadamente 200 ml, se dispone cuidadosamente en capas sobre Ficoll y se centrifuga a aproximadamente 1100 xg durante 20 minutos a 22 °C, y la capa interfaz de células de baja densidad se recoge para su procesamiento posterior.

5 Los sedimentos celulares pueden volver a suspenderse en la composición para la recogida de células madre recientes, o un medio adecuado para el mantenimiento celular, por ejemplo, para el mantenimiento de células madre, por ejemplo, medio asérico IMDM que contiene heparina 2U/ml y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY) El total de la fracción de células mononucleares se puede aislar, por ejemplo, utilizando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) según el procedimiento recomendado por el fabricante.

10 Las células madre placentarias obtenidas por perfusión o digestión pueden, por ejemplo, adicional o inicialmente, aislarse mediante tripsinización diferencial utilizando, p. ej., una solución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma, St. Louis, MO). La tripsinización diferencial es posible porque las células madre placentarias aisladas, que son adherentes a plástico de cultivo tisular, típicamente se desprenden de las superficies de plástico al cabo unos cinco minutos, mientras que otras poblaciones adherentes típicamente requieren más de 20-30 minutos de incubación. Las células madre placentarias desprendidas pueden recogerse después de tripsinización y neutralización con tripsina, utilizando, por ejemplo, Solución Neutralizante de Tripsina (TNS, Cambrex). En una realización de aislamiento de células adherentes, alícuotas de, por ejemplo, aproximadamente de 5-10 x 10⁶ células, se colocan en cada uno de diversos matraces T75, preferiblemente matraces T75 recubiertos con fibronectina. En una realización de este tipo, las células se pueden cultivar con medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas disponible en el comercio (MSCGM) (Cambrex), y colocarse en una incubadora de cultivo tisular (37 °C, CO₂ 5%). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se eliminan de los matraces mediante lavado con PBS. Después, el PBS se reemplaza por MSCGM.

25 El número y tipo de células recogidas de una placenta de mamífero se puede controlar, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular utilizando técnicas convencionales de detección de células tales como citometría de flujo, clasificación celular, inmunocitoquímica (por ejemplo, tinción con anticuerpos específicos de tejido o específicos de marcador celular), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, *fluorescence activated cell sorting*), clasificación celular activada por magnetismo (MACS, *magnetic activated cell sorting*), examinando la morfología de las células utilizando microscopía óptica o confocal, y/o midiendo cambios en la expresión génica utilizando técnicas bien conocidas en la materia, tales como PCR y perfil de expresión génica. Estas técnicas también se pueden utilizar para identificar células que son positivas para uno o más marcadores particulares. Por ejemplo, utilizando anticuerpos contra CD73, se puede determinar, utilizando las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad perceptible de CD73; y si es así, la célula es CD73⁺. Del mismo modo, si una célula produce suficiente ARN OCT-4 para ser perceptible mediante RT-PCR, o significativamente más ARN OCT-4 que una célula adulta (diferenciada terminalmente) (p. ej., un fibroblasto dérmico), la célula es OCT-4⁺. En una realización específica, la célula es positiva para un ARNm particular si el ARNm se amplifica por encima del fondo mediante RT-PCR, utilizando un par de cebadores apropiado, en 35 ciclos o menos. Los anticuerpos para marcadores de la superficie celular (por ejemplo, marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de genes específicos de células madre, tales como OCT-4, son muy conocidos en la técnica.

40 Las células madre placentarias, particularmente las células que se han aislado mediante separación con Ficoll, adherencia diferencial, o una combinación de ambas, se pueden clasificar, por ejemplo, utilizando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). La clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) es un método muy conocido para separar partículas, incluidas las células, en función de las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151: 150-165). En una realización, los anticuerpos o ligandos específicos de marcadores de la superficie celular, se marcan con diferentes marcadores fluorescentes. Las células se procesan a través del clasificador celular, lo que permite su separación en función de su capacidad de unirse a los anticuerpos utilizados. Las partículas clasificadas por FACS pueden depositarse directamente en pocillos individuales de placas de 96 o 384 pocillos, para facilitar la separación y la clonación.

50 En un esquema de clasificación, las células madre placentarias, por ejemplo, PDAC, se clasifican basándose en la expresión de uno o más de los marcadores CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD133, CD166, CD200 y / o KDR; es decir, las células madre placentarias se clasifican basándose en la expresión de uno o más de CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 o CD200 y/o en la ausencia de expresión de CD34, CD45, CD133 o KDR. Esto se puede realizarse junto con procedimientos para seleccionar dichas células en función de sus propiedades de adherencia en el cultivo. Por ejemplo, la selección de adherencia a plástico de cultivo tisular puede realizarse antes o después de la clasificación en función de la expresión del marcador. En una realización, por ejemplo, las células se clasifican primero en función de su expresión de CD34; las células CD34⁻ se retienen y las células CD34⁺ que además son una o más de CD73⁺, CD90⁺ o CD200⁺, se separan de las demás células CD34⁻. En otra realización, las células de la placenta se clasifican en función de su expresión de CD200; por ejemplo, las células que muestran CD200 se aíslan para su uso posterior. Las células que expresan, por ejemplo, CD200 pueden, en una realización específica, clasificarse adicionalmente en función de su expresión de CD73 y / o CD105, o epítomos reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o ausencia de expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, en otra realización, las células madre placentarias se clasifican por expresión, o ausencia de ella, de CD200, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y células madre placentarias que son CD200⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻ se aíslan de otras células placentarias para su uso posterior.

La clasificación de células puede utilizarse para confirmar la identidad de una población de células madre placentarias. Por ejemplo, las células madre placentarias adherentes a plástico de cultivo tisular, por ejemplo, las PDAC, descritas en esta memoria, se pueden cultivar durante uno o más pases, después se recogen y una muestra se caracteriza utilizando anticuerpos contra CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 y / o CD200, para determinar si, por ejemplo, el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de las células cultivadas son CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺ y / o CD200⁺.

En realizaciones específicas de cualquiera de las realizaciones anteriores de células madre placentarias clasificadas, al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células en una población celular que permanece después de la clasificación son dichas células madre placentarias aisladas. Las células madre placentarias pueden clasificarse mediante uno o más de cualquiera de los marcadores descritos en la Sección 5.2.2 anterior. En una realización específica, por ejemplo, las células placentarias que son (1) adherentes a plástico de cultivo tisular, y (2) CD10⁺, CD34⁻ y CD105⁺ se clasifican de (es decir, se aíslan de) otras células placentarias. En otra realización específica, las células placentarias que son (1) adherentes a plástico de cultivo tisular, y (2) CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ y CD200⁺ se clasifican de (es decir, se aíslan de) otras células placentarias. En otra realización específica, las células placentarias que son (1) adherentes a plástico de cultivo tisular, y (2) CD10⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺ se clasifican de (es decir, se aíslan de) otras células placentarias. Sin embargo, las células madre placentarias no necesitan clasificarse según un marcador celular particular, o conjunto de marcadores celulares, para "aislarse".

Con respecto a la detección y / o análisis basados en secuencias de nucleótidos de células madre placentarias, las secuencias para los marcadores enumerados en la presente memoria están fácilmente disponibles en bases de datos disponibles al público, tales como GenBank o EMBL.

Con respecto a la detección y clasificación mediada por anticuerpos de células madre placentarias, por ejemplo, células madre placentarias o células multipotentes placentarias, se puede utilizar cualquier anticuerpo específico para un marcador particular, en combinación con cualquier fluoróforo u otro marcador adecuado para la detección y clasificación de células (p. ej., clasificación celular activada por fluorescencia). Las combinaciones de anticuerpo/fluoróforo para marcadores específicos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra HLA-G (disponible en Serotec, Raleigh, Carolina del Norte), CD10 (disponible en BD Immunocytometry Systems, San José, California), CD44 (disponible en BD Biosciences Pharmingen, San José, California) y CD105 (disponible en R & D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota); anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (PE) contra CD44, CD200, CD117 y CD13 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina-Cy7 (PE Cy7) contra CD33 y CD10 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados con alofococianina (APC) y estreptavidina contra CD38 (BD Biosciences Pharmingen); y CD90 marcado con biotina (biotinilado) (BD Biosciences Pharmingen). Otros anticuerpos que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, CD133-APC (Miltenyi), KDR-Biotina (CD309, Abeam), citoqueratina-Fitc (Sigma o Dako), HLA ABC-Fitc (BD), HLA DR, DQ, DP-PE (BD), β -2-microglobulina-PE (BD), CD80-PE (BD) y CD86-APC (BD). Otras combinaciones de anticuerpo / marcador que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, CD45-PerCP (proteína peridinin clorofila); CD44-PE; CD10-F (fluoresceína); HLA-G-F y 7-amino-actinomicina-D (7-AAD); HLA-ABC-F; y similares. Esta lista no es exhaustiva, y en el comercio se también se dispone de otros anticuerpos de otros proveedores.

Las células madre placentarias aisladas pueden someterse a ensayo para CD117 o CD133 utilizando, por ejemplo, anticuerpos monoclonales conjugados con biotina, estreptavidina y ficoeritrina-Cy5 (PE Cy5) contra CD117 o CD133; sin embargo, al utilizar este sistema, las células pueden parecerse positivas para CD117 o CD133, respectivamente, debido a un fondo relativamente alto.

Las células madre placentarias aisladas se pueden marcar con un anticuerpo para un solo marcador y se pueden detectar y clasificar. Las células madre placentarias también pueden marcarse simultáneamente con múltiples anticuerpos para diferentes marcadores.

En otra realización, se pueden utilizar perlas magnéticas para separar células, por ejemplo, separar células madre placentarias de otras células placentarias. Las células pueden clasificarse utilizando una técnica de clasificación celular activada por magnetismo (MACS), un método para separar partículas en función de su capacidad para unirse a perlas magnéticas (de 0,5-100 μ m de diámetro). Se pueden realizar diversas modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluida la adición covalente de un anticuerpo que reconoce específicamente una molécula o hapteno de superficie celular particular. Después, las perlas se mezclan con las células para permitir la unión. Las células se hacen pasar a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de superficie celular específico. En una realización, estas células pueden después aislarse y volverse a mezclar con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de superficie celular adicionales. Las células se hacen pasar nuevamente a través de un campo magnético, aislando las células que se unen a ambos anticuerpos. Dichas células pueden después diluirse en placas distintas, tales como placas de microtitulación, para su aislamiento clonal.

Las células madre placentarias aisladas también se pueden caracterizar y / o clasificar según características morfológicas y de crecimiento celular. Por ejemplo, las células madre placentarias aisladas se pueden caracterizar

por tener, y/o se pueden seleccionar, basándose, por ejemplo, en un aspecto fibroblastoide en cultivo. Las células madre placentarias aisladas también se pueden caracterizar por tener, y/o se pueden seleccionar, basándose en su capacidad para formar cuerpos similares a embriones. En una realización, por ejemplo, las células madre placentarias que tienen forma de fibroblastoide, expresan CD73 y CD105, y que producen uno o más cuerpos similares a embriones en cultivo, se aíslan de otras células placentarias. En otra realización, las células madre placentarias OCT-4⁺ que producen uno o más cuerpos similares a embriones en cultivo se aíslan de otras células placentarias.

Las células madre placentarias aisladas pueden evaluarse en cuanto a su viabilidad, potencial de proliferación y longevidad, utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como ensayo de exclusión con azul de tripano, ensayo de absorción de diacetato de fluoresceína, ensayo de absorción de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y ensayo de absorción de timidina, ensayo de proliferación celular con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (para evaluar la proliferación). La longevidad puede determinarse por métodos bien conocidos en la técnica, tales como determinando el número máximo de generaciones poblacionales en un cultivo prolongado.

Las células madre placentarias aisladas, por ejemplo, las células madre placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2 anterior, también pueden separarse de otras células placentarias utilizando otras técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación basada la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta tal como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación y descongelación; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación a contracorriente); separación unigravitacional; distribución a contracorriente; electroforesis; y similares.

5.4 CULTIVO DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS AISLADAS

5.4.1 Medios de cultivo

Las células placentarias aisladas, o el tejido placentario a partir del cual crecen las células madre placentarias, se pueden utilizar para iniciar, o sembrar, cultivos de células madre placentarias. Las células generalmente se transfieren a recipientes estériles de cultivo tisular ya sea sin recubrir o recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina y proteína de membrana extracelular (p. ej., MATRIGEL® (BD Descubrimiento Labware, Bedford, Mass.)). Para el cultivo de BM-MSC pueden utilizarse procedimientos similares.

Se pueden cultivar células placentarias aisladas, por ejemplo, células madre placentarias aisladas, en cualquier medio y en cualquier condición reconocidos en la técnica como aceptables para el cultivo de células, por ejemplo, células madre. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende suero, por ejemplo, suero bovino, suero humano, o similar. Las células madre placentarias aisladas se pueden cultivar, por ejemplo, en DMEM-LG (medio esencial de Dulbecco modificado con bajo contenido en glucosa) / MCDB 201 (medio basal de fibroblastos de pollo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA + BSA (ácido linoleico - albúmina de suero de bovino), ácido L-ascórbico y dexametasona, PDGF, EGF, IGF-1 y penicilina/estreptomina; DMEM-HG (con alto contenido en glucosa) que comprende suero bovino fetal (FBS) al 10%; DMEM-HG que comprende FBS al 15%; IMDM (medio de Dulbecco modificado por Iscove) que comprende FBS al 10%, suero de caballo al 10% e hidrocortisona; M199 que comprende FBS 1% a 20%, EGF y heparina; α -MEM (medio esencial mínimo) que comprende FBS al 10%, GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende FBS al 10%, GLUTAMAX™ y gentamicina, etc.

Otros medios que pueden utilizarse para cultivar células madre placentarias incluyen DMEM (con alto o bajo contenido en glucosa), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE.

El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferiblemente aproximadamente 2-15% (v/v); suero equino (de caballo) (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferiblemente aproximadamente 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluida L-valina; y uno o más antibióticos y/o agentes antimicrobianos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, sola o en combinación.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias adecuadas para su uso en los métodos descritos en esta memoria pueden cultivarse en un medio que comprende medio DMEM complementado con suero fetal bovino (FBS, por ejemplo, FBS 1,9% v/v), ácido linolénico-albúmina (p. ej., 0,01% v/v) (Sigma), insulina-transferrina-selenio (0,97% v/v) (Invitrogen, Carlsbad, CA), gentamicina (p. ej., 48 μ g/ml) (Invitrogen), ácido L-ascórbico 2 fosfato

sesquimagnesio (por ejemplo, 97 μM) (Sigma), dexametasona 48 nM (Sigma), PDGF-BB humano recombinante (por ejemplo, 9,7 ng/ml) (Invitrogen) y EGF humano recombinante (por ejemplo, 9,7 ng/ml) (Invitrogen).

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

15 En una realización, las células madre placentarias aisladas se cultivan en presencia de un compuesto que actúa para mantener un fenotipo indiferenciado en las células madre placentarias aisladas. En este contexto, "indiferenciado" no requiere una completa indiferenciación, por ejemplo, incluye un fenotipo relativamente indiferenciado en comparación con las células diferenciadas terminalmente, o las células madre placentarias causadas por diferenciación, tal como expresar una o más características de una célula diferenciada terminalmente. En una realización específica, el compuesto es una 3,4-dihidropiridimol[4,5-d]pirimidina sustituida. En otra realización específica, el compuesto es un compuesto que tiene la siguiente estructura química:



20 El compuesto se puede poner en contacto con células madre placentarias aisladas a una concentración, por ejemplo, de entre aproximadamente $1 \mu\text{M}$ y aproximadamente $10 \mu\text{M}$.

5.4.2 Expansión y proliferación de células madre placentarias

25 Una vez aisladas las células madre placentarias (p. ej., separadas de al menos el 50% de las células placentarias con las cuales las células madre placentarias se asocian normalmente *in vivo*), las células o población de células pueden proliferar y expandirse *in vitro*. Por ejemplo, las células madre placentarias aisladas pueden cultivarse en recipientes de cultivo tisular, por ejemplo, placas, matraces, placas multipocillo, o similares, durante un tiempo suficiente para que las células proliferen hasta una confluencia de 70-90%, es decir, hasta que las células y su progenie ocupen el 70-90% del área de superficie de cultivo del recipiente de cultivo tisular.

30 Las células madre placentarias aisladas se pueden sembrar en vasos de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. Por ejemplo, las células pueden sembrarse de baja densidad (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 células/cm²) a alta densidad (por ejemplo, a aproximadamente 50.000 células/cm² o más). En una realización preferida, las células se cultivan en presencia de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO₂ en el aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O₂ en el aire, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento de O₂ en el aire. Las células se cultivan preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente a 37 °C. Las células se cultivan preferiblemente en una incubadora. El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, utilizando un biorreactor. Las células madre placentarias, en determinadas realizaciones, se cultivan con estrés oxidativo bajo (por ejemplo, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína, o similares).

40 Una vez que se obtiene una confluencia menor de 100%, por ejemplo, de 70% a 90%, las células pueden someterse a pases. Por ejemplo, las células pueden tratarse enzimáticamente, por ejemplo, con tripsina, utilizando técnicas bien conocidas en la materia, para separarlas de la superficie del cultivo tisular. Después de retirar las células con una pipeta y de realizar un recuento de las mismas, se realiza un pase de aproximadamente 10.000 a 100.000 células/cm² a un nuevo recipiente de cultivo que contiene medio de cultivo reciente. Típicamente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del que se extrajeron las células madre placentarias aisladas. Las células madre placentarias aisladas pueden someterse a pases aproximadamente, al menos, o no más de, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces, o más.

5.4.3 Poblaciones de células madre placentarias aisladas

En la presente memoria también se proporcionan poblaciones de células madre placentarias aisladas, por ejemplo, las células madre placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2 anterior, útiles en los métodos y composiciones descritos en esta memoria. Las poblaciones de células madre placentarias aisladas se pueden aislar directamente de una o más placentas; es decir, la población de células puede ser una población de células placentarias que comprende las células placentarias aisladas, en donde las células madre placentarias aisladas se obtienen de un perfundido, o están contenidas en el mismo, o se obtienen de tejido placentario alterado, o están contenidas en el mismo, por ejemplo, un digerido de tejido placentario (es decir, la recogida de células obtenidas por digestión enzimática de una placenta o de una parte de la misma). Las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria, también se pueden cultivar y expandir para producir poblaciones de células madre placentarias aisladas. Las poblaciones de células placentarias que comprenden las células madre placentarias aisladas también se pueden cultivar y expandir para producir poblaciones de células madre placentarias.

Las poblaciones de células madre placentarias útiles en los métodos de tratamiento proporcionados en esta memoria, comprenden las células madre placentarias aisladas, por ejemplo, las células madre placentarias aisladas como se describe en la Sección 5.2.2 de este documento. En diversas realizaciones, al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% de las células en una población de células placentarias son las células madre placentarias aisladas. Es decir, una población de las células placentarias aisladas puede comprender, por ejemplo, tanto como 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de células que no son las células madre placentarias aisladas.

Las poblaciones de células placentarias aisladas, que comprenden las células madre placentarias aisladas, útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden producirse, por ejemplo, seleccionando células placentarias aisladas, ya sea obtenidas por digestión o perfusión enzimática, que expresan marcadores particulares y/o características morfológicas o de cultivo particulares. En diversas realizaciones, por ejemplo, proporcionadas en la presente memoria, se hace referencia a un método para producir una población celular seleccionando células placentarias que comprenden células madre placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan cualquiera de uno, o cualquier combinación de, los marcadores de citometría de flujo y/o las características de expresión genética descritos en esta memoria, por ejemplo, anteriormente en la Sección 5.2.

En otro aspecto, pueden producirse poblaciones de células madre placentarias, por ejemplo, las células madre placentarias descritas anteriormente en la Sección 5.2, seleccionando tanto las características de expresión de marcadores como la capacidad de la población de células madre placentarias, por ejemplo, de una muestra de la población de células madre placentarias, para suprimir, por ejemplo, suprimir de manera perceptible, la proliferación de células de un cáncer relacionado con hueso. En varias realizaciones, las células de un cáncer relacionado con hueso son células de mieloma múltiple, células de condrosarcoma, células de cáncer de hueso, células de neuroblastoma, células de osteosarcoma, células de sarcoma de Ewing, células de cordoma, células de histiocitoma fibroso maligno de hueso, células de cáncer de próstata o células de fibrosarcoma de hueso. Dicha selección se puede aplicar, por ejemplo, a diferentes poblaciones de células madre placentarias, por ejemplo, tandas o lotes de células madre placentarias para identificar poblaciones que cumplan, por ejemplo, determinados criterios predeterminados para lograr eficacia.

La selección de poblaciones de células que comprenden células madre placentarias que tienen cualquiera de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente en la Sección 5.2.2, se puede aislar u obtener de manera similar.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, la selección de las poblaciones de células aisladas puede comprender adicionalmente seleccionar células madre placentarias que expresen ABC-p (una proteína transportadora ABC específica de la placenta; véase, por ejemplo, Allikmets et al., Cancer Res. 58 (23): 5337-9 (1998)). El método también puede comprender la selección de células que muestren al menos una característica específica, por ejemplo, de una célula madre mesenquimatosas, por ejemplo, expresión de CD44, la expresión de CD90 o expresión de una combinación de lo anterior.

En las realizaciones anteriores, el sustrato puede ser cualquier superficie en donde se pueda realizar el cultivo y / o la selección de células, por ejemplo, células madre placentarias aisladas. Típicamente, el sustrato es plástico, por ejemplo, un plástico de una placa de cultivo tisular o multipocillo. El plástico de cultivo tisular puede recubrirse con una biomolécula, por ejemplo, laminina o fibronectina.

Las células madre placentarias aisladas pueden seleccionarse por cualquier medio conocido en la técnica de selección celular. Por ejemplo, las células se pueden seleccionar utilizando uno o más anticuerpos para uno o más marcadores de superficie celular, por ejemplo, en citometría de flujo o FACS. La selección puede realizarse utilizando anticuerpos junto con perlas magnéticas. En la técnica se conocen anticuerpos que son específicos para determinados marcadores relacionados con células madre. Por ejemplo, anticuerpos para OCT-4 (Abeam, Cambridge, MA), CD200 (Abeam), HLA-G (Abeam), CD73 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), CD105 (Abeam, BioDesign International, Saco, ME), etc. Los anticuerpos para otros marcadores también están disponibles comercialmente, por ejemplo, CD34, CD38 y CD45 están disponibles, p. ej., en StemCell Technologies o BioDesign Internacional.

Las poblaciones de células madre placentarias aisladas pueden comprender células placentarias que no son células madre, o células que no son células placentarias.

5 Las poblaciones de células madre placentarias aisladas proporcionadas en esta memoria se pueden combinar con una o más poblaciones de células que no son células madre o placentarias. Por ejemplo, una población de células madre placentarias aisladas puede combinarse con sangre (por ejemplo, sangre de placenta o de cordón umbilical), células madre derivadas de sangre (por ejemplo, células madre derivadas de sangre de placenta o de cordón umbilical), células madre de cordón umbilical, poblaciones de células nucleadas derivadas de sangre, células mesenquimatosas derivadas de médula ósea, poblaciones de células madre derivadas de hueso, células madre adultas (somáticas) de médula ósea ordinaria, poblaciones de células madre incluidas en tejido, células madre cultivadas, poblaciones de células completamente diferenciadas (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, miocitos, cardiocitos, etc.) y similares. En una realización específica, una población de células útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria comprende células madre placentarias aisladas y células madre de cordón umbilical aisladas. En una población de células madre placentarias aisladas, las células se pueden combinar con una pluralidad de células de otro tipo en proporciones de aproximadamente 100.000.000:1; 50.000.000:1; 20.000.000:1; 10.000.000:1; 5.000.000:1; 2.000.000:1; 1.000.000:1; 500.000:1; 200.000:1; 100.000:1; 50.000:1; 20.000:1; 10.000:1; 5.000:1; 2.000:1; 1.000:1; 500:1; 200:1; 100:1; 50:1; 20:1; 10:1; 5:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:5.000; 1:10.000; 1:20.000; 1:50.000; 1:100.000; 1:500.000; 1:1.000.000; 1:2.000.000; 1:5.000.000; 1:10.000.000; 1:20.000.000; 1:50.000.000; o de aproximadamente 1:100.000.000, comparando los números de las células nucleadas totales en cada población. En una población de células madre placentarias aisladas, las células también se pueden combinar con una pluralidad de células de una pluralidad de tipos de células.

En una realización, una población de células madre placentarias aisladas se combina con una pluralidad de células madre hematopoyéticas. Dichas células madre hematopoyéticas pueden estar, por ejemplo, incluidas en una placenta, sangre de cordón umbilical o sangre periférica no procesada; en el total de las células nucleadas de la sangre placentaria, la sangre de cordón umbilical o la sangre periférica; en una población de células CD34⁺ aisladas de sangre placentaria, sangre de cordón umbilical o sangre periférica; en médula ósea no procesada; en el total de células nucleadas de la médula ósea; en una población de células CD34⁺ aisladas de médula ósea, o similar.

En otras realizaciones, una población de las células madre placentarias descritas en la presente memoria, por ejemplo, las PDAC descritas en la Sección 5.2.2 anterior, se combinan con células adherentes placentarias osteogénicas (OPAC, *osteogenic placental adherent cells*), por ejemplo, las OPAC descritas en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2010/0047214. En otras realizaciones, una población de células madre placentarias descritas en la presente memoria, por ejemplo, las PDAC descritas en la Sección 5.2.2 anterior, se combinan con perfundido placentario y / o linfocitos citolíticos naturales, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales de perfundido placentario, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales intermedios placentarios, por ejemplo, como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N° 2009/0252710.

5.5 CONSERVACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

Las células madre placentarias aisladas, por ejemplo, las células madre placentarias aisladas descritas anteriormente, se pueden conservar, es decir, se pueden poner en condiciones que permitan su conservación prolongada, o en condiciones que inhiban la muerte celular, por ejemplo, por apoptosis o necrosis.

40 Las células madre placentarias pueden conservarse utilizando, por ejemplo, una composición que comprenda un inhibidor de la apoptosis, un inhibidor de la necrosis y / o un perfluorocarbono transportador de oxígeno, como se describe en la Publicación de Solicitud de Estados Unidos N° 2007/0190042. En una realización, un método para conservar una población de células, por ejemplo, células madre placentarias, comprende poner en contacto dicha población de células con una composición para la recogida de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono transportador de oxígeno, en donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o impedir que se produzca la apoptosis en la población de células, en comparación con una población de células que no se han puesto en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de caspasa. En otra realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de JNK. En otra realización específica, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación o proliferación de dichas células. En otra realización, dicha composición para la recogida de células comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono transportador de oxígeno en fases distintas. En otra realización, dicha composición para la recogida de células comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono transportador de oxígeno en una emulsión. En otra realización, la composición para la recogida de células comprende adicionalmente un emulsionante, por ejemplo, lecitina. En otra realización, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están a una temperatura entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 25 °C en el momento de la puesta en contacto de las células. En otra realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están a una temperatura entre aproximadamente 2 °C y 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 5 °C, en el momento de la puesta en contacto de las células. En otra realización específica, dicha puesta en contacto se realiza durante el transporte de dicha población de células. En otra realización específica, dicha puesta en contacto se realiza durante la congelación y descongelación de dicha población de células, por ejemplo, células madre placentarias.

Las poblaciones de células madre placentarias útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, pueden conservarse, por ejemplo, mediante un método que comprende poner en contacto dicha población de células con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto conservante de órganos, en donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o impedir que se produzca la apoptosis en la población de células, en comparación con una población de células que no se ha puesto en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, el compuesto conservante de órganos es una solución de UW (por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.798.824, también conocida como ViaSpan; véase también Southard et al., Transplantation 49 (2): 251-257 (1990)) o una solución descrita en Stern et al., Patente de Estados Unidos N° 5.552.267. En otra realización, dicho compuesto conservante de órganos es hidroxietil almidón, ácido lactobiónico, rafinosa o una combinación de los mismos. En otra realización, la composición para la recogida de células comprende adicionalmente un perfluorocarbono transportador de oxígeno, ya sea en dos fases o como una emulsión.

En otra realización del método, durante la perfusión, las células madre placentarias se ponen en contacto con una composición para la recogida de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y perfluorocarbono transportador de oxígeno, un compuesto conservante de órganos, o una combinación de los mismos. En otra realización, dichas células se ponen en contacto durante un proceso de alteración tisular, por ejemplo, digestión enzimática. En otra realización, las células madre placentarias se ponen en contacto con dicho compuesto para la recogida de células después de la recogida por perfusión, o después de la recogida por alteración tisular, por ejemplo, digestión enzimática.

Típicamente, durante la recogida, el enriquecimiento y el aislamiento de las células madre placentarias, es preferible minimizar o eliminar el estrés celular debido a hipoxia y a estrés mecánico. Por lo tanto, en otra realización del método, una célula, o población de células, por ejemplo, células madre placentarias, está expuesta a una condición hipóxica durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, en donde una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración normal de oxígeno en sangre. En otra realización específica, dicha población de células está expuesta a dicha condición hipóxica durante menos de dos horas durante dicha conservación. En otra realización específica, dicha población de células está expuesta a dicha condición hipóxica durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no está expuesta a una condición hipóxica, durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento. En otra realización específica, dicha población de células no está expuesta a esfuerzo cortante durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento.

Las células madre placentarias se pueden crioconservar, por ejemplo, en medio de crioconservación, en recipientes pequeños, por ejemplo, en ampollas. El medio de crioconservación adecuado incluye, pero sin limitación, medio de cultivo que incluye, p. ej., medio de crecimiento, o medio de congelación celular, por ejemplo, medio de congelación celular disponible en el comercio, por ejemplo, C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de crioconservación comprende preferiblemente DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración de aproximadamente 2% a aproximadamente 15% (v / v), por ejemplo, de aproximadamente 10% (v / v). El medio de crioconservación puede comprender otros agentes, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las células madre placentarias se enfrían preferiblemente a aproximadamente 1 °C / min durante la crioconservación. La crioconservación puede efectuarse llevando las células a una temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -180 °C, preferiblemente de aproximadamente -125 °C a aproximadamente -140 °C. Para su uso, las células crioconservadas pueden transferirse a nitrógeno líquido antes de la descongelación. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90 °C, se transfieren a una zona de almacenamiento con nitrógeno líquido. La crioconservación también puede realizarse utilizando un congelador de velocidad controlada. Las células crioconservadas se descongelan, preferiblemente, a una temperatura que varía de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

Las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea también pueden conservarse mediante cualquiera de los métodos anteriores.

5.6 COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS AISLADAS

Las células madre placentarias descritas en la presente memoria, por ejemplo, en la Sección 5.2.2, se pueden combinar con cualquier compuesto, composición o dispositivo fisiológicamente o médicamente aceptable para su uso en los métodos y composiciones descritos en esta memoria. En determinadas realizaciones, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una composición que comprende células madre placentarias en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria puede comprender adicionalmente células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea aisladas, o médula ósea que comprende BM-MSC, por ejemplo, las BM-MSC descritas en la Patente de Estados Unidos N° 5.486.359.

En determinadas realizaciones, una composición que comprende las células madre placentarias aisladas comprende adicionalmente una matriz, por ejemplo, una matriz descelularizada o una matriz sintética. En otra realización específica, dicha matriz es un armazón tridimensional. En otra realización específica, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina o vitronectina. En otra realización específica, la matriz es

una membrana amniótica o un biomaterial derivado de membrana amniótica. En otra realización específica, dicha matriz comprende una proteína de membrana extracelular. En otra realización específica, dicha matriz comprende un compuesto sintético. En otra realización específica, dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otra realización específica, dicho compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, una citocina, un anticuerpo, o una molécula orgánica inferior a 5.000 dalton.

En otra realización, una composición útil en los métodos de tratamiento proporcionados en esta memoria comprende un medio acondicionado para cualquiera de las células madre placentarias anteriores, o cualquiera de las poblaciones de células madre placentarias anteriores.

5.6.1 Células crioconservadas

Las células madre placentarias aisladas, útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, pueden conservarse, por ejemplo, crioconservarse para su uso posterior. En la técnica se conocen bien métodos para la crioconservación de células, tales como células madre. Las poblaciones de células madre placentarias aisladas se pueden preparar de una forma que sea fácilmente administrable a un individuo, por ejemplo, una población de células madre placentarias aisladas que esté dentro de un recipiente que sea adecuado para uso médico. Un recipiente de este tipo puede ser, por ejemplo, una jeringa, una bolsa de plástico estéril, un matraz, un frasco u otro recipiente a partir del cual se puede dispensar fácilmente la población de células placentarias aisladas. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico, aceptable desde el punto de vista médico, adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El recipiente es preferiblemente uno que permita la crioconservación de las células madre placentarias aisladas.

Las células madre placentarias aisladas crioconservadas pueden comprender células placentarias aisladas procedentes de un solo donante o de varios donantes. La población de células madre placentarias aisladas puede ser completamente compatible, o parcial o completamente incompatible, con el HLA de un receptor destinatario.

Por lo tanto, en una realización, las células madre placentarias aisladas pueden utilizarse en los métodos descritos en la presente memoria en forma de una composición que comprende un recipiente, una población de células madre placentarias adherentes a plástico de cultivo tisular. En una realización específica, las células madre placentarias aisladas están crioconservadas. En otra realización específica, el recipiente es una bolsa, un matraz o un frasco. En otra realización específica, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. En otra realización específica, dicha bolsa es adecuada, permite o facilita, la administración intravenosa de dicha población de células madre placentarias aisladas, por ejemplo, por infusión intravenosa. La bolsa puede comprender múltiples lúmenes o compartimentos que están interconectados para permitir la mezcla de las células madre placentarias aisladas y una o más soluciones distintas, por ejemplo, un fármaco, antes o durante, la administración. En otra realización específica, la composición comprende uno o más compuestos que facilitan la crioconservación de las células madre placentarias. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas están incluidas en una solución acuosa fisiológicamente aceptable. En otra realización específica, dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable es una solución de NaCl al 0,9 %. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas comprenden células madre placentarias que son compatibles con el HLA de un receptor de dichas células madre placentarias. En otra realización específica, dicha población de células combinada comprende células madre placentarias que son al menos parcialmente incompatibles con el HLA de un receptor de dichas células madre placentarias. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas proceden de una pluralidad de donantes.

En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas en el recipiente, son cualquiera de las células madre placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2 de este documento, en donde dichas células se han crioconservado y están dentro de un recipiente.

En una realización específica de cualquiera de las células madre placentarias aisladas crioconservadas anteriores, dicho recipiente es una bolsa. En diversas realizaciones específicas, dicho recipiente comprende aproximadamente, al menos, o como máximo, 1×10^6 de dichas células madre placentarias aisladas, 5×10^5 de dichas células madre placentarias aisladas, 1×10^7 de dichas células madre placentarias aisladas, 5×10^7 de dichas células madre placentarias aisladas, 1×10^8 de dichas células madre placentarias aisladas, 5×10^8 de dichas células madre placentarias aisladas, 1×10^9 de dichas células madre placentarias aisladas, 5×10^9 de dichas células madre placentarias aisladas, 1×10^{10} de dichas células madre placentarias aisladas o 1×10^{10} de dichas células madre placentarias aisladas. En otras realizaciones específicas de cualquiera de las poblaciones crioconservadas anteriores, dichas células madre placentarias aisladas se han sometido a pases aproximadamente, al menos, o no más de, 5 veces, no más de 10 veces, no más de 15 veces, o no más de 20 veces. En otra realización específica de cualquiera de las células madre placentarias aisladas crioconservadas anteriores, dichas células madre placentarias aisladas se han expandido en dicho recipiente.

5.6.2 Células madre placentarias modificadas mediante ingeniería genética

En la presente memoria también se proporcionan células madre placentarias, en las que las células madre placentarias se han modificado mediante ingeniería genética para producir citocinas recombinantes o exógenas

asociadas a la supresión tumoral. Por ejemplo, en diversas realizaciones, las células madre placentarias están modificadas mediante ingeniería genética para expresar cantidades perceptibles de proteína exógena, en donde dicha proteína exógena es una o más de una proteína morfogenética ósea (BMP), activina A, osteonectina, osteoprotegerina o una conexina. Las secuencias que codifican la activina A se pueden encontrar, por ejemplo, en el GenBank con el No. de registro NM_002191. Las secuencias que codifican la osteonectina se pueden encontrar, por ejemplo, en el GenBank con el No. de registro NM_003118. Las secuencias que codifican la osteoprotegerina se pueden encontrar, por ejemplo, en el GenBank con el No. de registro NM_002546.

En realizaciones específicas, la conexina es conexina 26 (Cx26) o conexina 43 (Cx43). Las secuencias que codifican Cx26 o Cx43 se pueden encontrar, por ejemplo, en el GenBank con los Nos. de registro NM_004004 y NM_000165, respectivamente.

En realizaciones específicas, dicha proteína morfogenética ósea es una o más de BMP1 (proteína morfogenética ósea 1), BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9 (GDF2; Factor 2 de diferenciación de crecimiento), BMP10, BMP11 (GDF11), BMP12 (GDF7), BMP13 (GDF6), BMP14 (GDF5) o BMP15, o cualquiera de sus combinaciones. Las secuencias que codifican las BMP se pueden encontrar, por ejemplo, en el GenBank, por ejemplo, con el No. de registro NM_001199 (BMP1), NM_001200 (BMP2), NM_001201 (BMP3), NM_001202 (BMP4), NM_021073 (BMP5), NM_021073 (BMP6), NM_001719 (BMP7), NM_181809 (BMP8a), NM_001720 (BMP8b), NM_016204 (BMP9/GDF2), NM_014482 (BMP10), NM_005811 (BMP11/GDF11), NM_182828 (BMP12/GDF7), NM_001001557 (BMP13/GDF6), NM_000557 (BMP14/GDF5) o NM_005448 (BMP15).

En otras realizaciones, proporcionadas en esta memoria, se hace referencia a células madre placentarias aisladas, en las que dichas células se modifican mediante ingeniería genética para expresar IFN- β o IL-2 exógenos. En una realización específica, dichas células madre placentarias expresan IFN- β o IL-2 exógenos en una cantidad que da como resultado una mayor, por ejemplo, perceptiblemente mayor, supresión de la proliferación de células tumorales, cuando dichas células tumorales se ponen en contacto con dichas células madre placentarias, en comparación con las células madre placentarias que no expresan IFN- β o IL-2 exógenos.

Se pueden utilizar métodos para modificar células mediante ingeniería genética, por ejemplo con vectores retrovíricos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, polietilenglicol, u otros métodos conocidos por los expertos en la materia. Estos incluyen el uso de vectores de expresión que transportan y expresan moléculas de ácido nucleico en las células. (Véase Geoddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)). El ADN vectorial se puede introducir en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Pueden encontrarse métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped en Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), y en otros libros de texto de laboratorio.

Las células madre placentarias pueden modificarse mediante ingeniería genética introduciendo ADN o ARN en la célula, por ejemplo, ADN o ARN que codifica una proteína de interés, mediante métodos que incluyen la transferencia de virus, incluido el uso de vectores víricos de ADN o ARN, tales como retrovirus (incluidos los lentivirus), virus del simio 40 (SV40), adenovirus, virus Sindbis y virus del papiloma bovino, por ejemplo; transferencia de productos químicos, incluida la transfección de fosfato de calcio y los métodos de transfección de DEAE dextrano; transferencia de fusión de membrana, utilizando vesículas de membrana cargadas con ADN tales como liposomas, eritrocitos fantasma y protoplastos, por ejemplo; o técnicas de transferencia física, tales como microinyección, electroporación o transferencia de ADN desnudo. Las células madre placentarias pueden alterarse genéticamente mediante inserción de ADN exógeno, o mediante sustitución de un segmento del genoma celular con ADN exógeno. La inserción de una o más secuencias de ADN exógeno puede realizarse, por ejemplo, mediante recombinación homóloga o mediante integración de virus en el genoma de la célula hospedadora, o incorporando el ADN en la célula, particularmente en su núcleo, utilizando un vector de expresión plasmídico y una secuencia de localización nuclear. El ADN puede comprender uno o más promotores que permiten la inducción positiva o negativa de la expresión de la proteína de interés utilizando ciertos productos químicos / fármacos, por ejemplo, tetraciclina; en otras realizaciones los promotores pueden ser constitutivos.

La transfección de fosfato de calcio puede utilizarse para introducir, en una célula, por ejemplo, en una célula madre placentaria, por ejemplo, ADN plasmídico que contiene una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de interés. En determinadas realizaciones, el ADN se combina con una solución de cloruro de calcio y después se agrega a una solución tamponada con fosfato. Una vez que se forma un precipitado, la solución se agrega directamente a las células cultivadas. El tratamiento con DMSO o glicerol puede utilizarse para mejorar la eficacia de la transfección, y los niveles de transfectantes estables se pueden mejorar utilizando bis-hidroxietilamino etanosulfonato (BES). Los sistemas de transfección de fosfato de calcio están disponibles en el comercio (por ejemplo, PROFECTION®, Promega Corp., Madison, Wis.). También puede utilizarse transfección de DEAE-dextrano.

Las células madre placentarias aisladas también pueden modificarse mediante ingeniería genética por microinyección. En determinadas realizaciones, una micropipeta de vidrio se guía al interior del núcleo de células con un microscopio óptico para inyectar ADN o ARN.

Las células madre placentarias también pueden modificarse mediante ingeniería genética utilizando electroporación. En determinadas realizaciones, a una suspensión de células cultivadas se añade ADN o ARN, y la suspensión de células con ADN/ARN se coloca entre dos electrodos y se somete a un pulso eléctrico, causando una permeabilidad transitoria en la membrana externa de la célula que se manifiesta por la aparición de poros a través de la membrana.

El suministro de ADN o ARN por liposomas para modificar mediante ingeniería genética las células, puede realizarse utilizando liposomas catiónicos, incluyendo opcionalmente dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) o dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), por ejemplo, LIPOFECTIN® (Life Technologies, Inc.). Otros sistemas de suministro disponibles en el comercio incluyen EFFECTENE™ (Qiagen), DOTAP (Roche Molecular Biochemicals), FUGENE 6™ (Roche Molecular Biochemicals) y TRANSFECTAM® (Promega).

Los vectores víricos pueden utilizarse para alterar genéticamente las células madre placentarias suministrando en las células, por ejemplo, genes, polinucleótidos, moléculas antisentido o secuencias ribozimáticas diana. Los vectores retrovíricos son eficaces para transducir células que se dividen rápidamente, aunque se ha desarrollado una serie de vectores retrovíricos para transferir eficazmente también ADN a las células que no se dividen. Los expertos en la materia conocen bien líneas celulares de presentación de vectores retrovíricos. En determinadas realizaciones, un vector de ADN retrovírico contiene dos LTR retrovíricas, de tal manera que una primera LTR se localiza en 5' con respecto al promotor SV40, que está unido operativamente a la secuencia génica diana clonada en un sitio multiclonal, seguido de una segunda LTR en 3'. Una vez formado, el vector de ADN retrovírico se transfiere a una línea celular de presentación utilizando transfección mediada con fosfato de calcio, como se describió anteriormente. Después de aproximadamente 48 horas de producción de virus, el vector vírico, que ahora contiene la secuencia del gen diana, se recoge. En la técnica se conocen métodos de transfección de células utilizando vectores lentivíricos, herpesvirus recombinantes, vectores adenovíricos o vectores alfavíricos.

El éxito de la transfección o transducción de células diana se puede demostrar utilizando marcadores genéticos, en una técnica conocida por los expertos en la materia. La proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria*, por ejemplo, ha demostrado ser un marcador eficaz para identificar y rastrear células hematopoyéticas modificadas mediante ingeniería genética. Como marcadores de selección alternativos se incluyen el gen de β -Gal, el receptor de la forma truncada del factor de crecimiento nervioso o marcadores de selección de fármacos (incluidos, pero sin limitación, NEO, MTX o higromicina).

Las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea pueden modificarse mediante ingeniería genética mediante cualquiera de los métodos y/o cualquiera de los genes descritos anteriormente.

5.6.3 Composiciones Farmacéuticas

Las poblaciones de células madre placentarias aisladas, o poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas, se pueden formular en composiciones farmacéuticas para uso *in vivo*, por ejemplo, en los métodos de tratamiento proporcionados en esta memoria. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden una población de células madre placentarias aisladas, o una población de células que comprenden células madre placentarias aisladas, en un transportador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución salina u otra solución aceptada fisiológicamente aceptable para la administración *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las células madre placentarias aisladas descritas en esta memoria pueden comprender cualquiera, o cualquier combinación, de las células madre placentarias aisladas descritas en cualquier parte en esta memoria. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células madre placentarias fetales, maternas, o tanto fetales como maternas, aisladas. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender además células madre placentarias aisladas obtenidas de un solo individuo o placenta, o de varios individuos o placentas.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta memoria pueden comprender cualquier cantidad de células madre placentarias aisladas. Por ejemplo, una sola dosis unitaria de células madre placentarias aisladas puede comprender, en varias realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células madre placentarias aisladas, o de 1×10^5 a 5×10^5 , 5×10^5 a 1×10^6 , 1×10^6 a 5×10^6 , 5×10^6 a 1×10^7 , 1×10^7 a 5×10^7 , 5×10^7 a 1×10^8 , 1×10^8 a 5×10^8 , 5×10^8 a 1×10^9 , 1×10^9 a 5×10^9 , 5×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^{10} a 5×10^{10} o 5×10^{10} a 1×10^{11} células madre placentarias aisladas..

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria comprenden poblaciones de células madre placentarias que comprenden 50% de células viables o más (es decir, al menos el 50% de las células de la población son funcionales o viven). Preferiblemente, al menos el 60% de las células de la población son viables. Más preferiblemente, al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las células de la población en la composición farmacéutica son viables.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta memoria pueden comprender uno o más compuestos que, por ejemplo, facilitan el injerto (por ejemplo, anticuerpos contra receptores de linfocitos T, un inmunosupresor o similar); estabilizantes tales como albúmina, dextrano 40, gelatina, hidroxietil almidón, Plasmalyte y similares.

Cuando se formula como una solución inyectable, en una realización, la composición farmacéutica comprende aproximadamente HSA del 1% al 1,5% y aproximadamente dextrano al 2,5%. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 5×10^6 células por mililitro a aproximadamente 2×10^7 células por mililitro en una solución que comprende HSA al 5% y dextrano al 10%, que opcionalmente

5

comprende un inmunosupresor, por ejemplo, ciclosporina A en, por ejemplo, 10 mg / kg.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica, por ejemplo, una solución, comprende células madre placentarias aisladas, en donde dicha composición farmacéutica comprende entre aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro a aproximadamente $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células por mililitro. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por mililitro a aproximadamente $3,75 \times 10^6$ células por mililitro. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 50×10^6 células/ml, aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 40×10^6 células/ml, aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 30×10^6 células/ml, aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 20×10^6 células/ml, aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 15×10^6 células/ml, o entre aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente 10×10^6 células/ml. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica no comprende masas de células visibles (es decir, no tiene, masas macrocelulares), ni sustancialmente dichos grupos visibles. Como se usa en la presente memoria, "masas macrocelulares" significa una agregación de células visible sin aumento, por ejemplo, visible a simple vista, y generalmente se refiere a una agregación celular mayor que aproximadamente 150 micrómetros. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende aproximadamente un porcentaje de dextrano, por ejemplo, dextrano-40, de 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% o de 10%. En una realización específica, dicha composición comprende un porcentaje de dextrano-40 de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9%. En una realización específica, dicha composición comprende un porcentaje de dextrano-40 de aproximadamente 5,5%. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica comprende albúmina de suero humano (HSA) de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%. En realizaciones específicas, la composición farmacéutica comprende un porcentaje de HSA de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6,5, 7,5, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%. En una realización específica, dichas células se han criopreservado y descongelado. En otra realización específica, dichas células se han filtrado a través de un filtro de $70 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$. En otra realización específica, dicha composición no comprende masas celulares visibles. En otra realización específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 200 masas celulares por 10^6 células, en donde dichas masas celulares son visibles solo al microscopio, por ejemplo, al microscopio óptico. En otra realización específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 150 masas celulares por 10^6 células, en donde dichas masas celulares son visibles sólo al microscopio, por ejemplo, al microscopio óptico. En otra realización específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 100 masas celulares por 10^6 células, en donde dichas masas celulares son visibles sólo al microscopio, por ejemplo, al microscopio óptico.

10

15

20

25

30

35

En una realización específica, la composición farmacéutica comprende aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro, dextrano-40 a aproximadamente 5,5% (p/v), HSA a aproximadamente 10% (p/v) y DMSO a aproximadamente 5% (v/v).

En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende una pluralidad de células madre placentarias aisladas en una solución que comprende dextrano 40 al 10%, en donde la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro a aproximadamente $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células por mililitro, y en donde dicha composición no comprende masas celulares visibles a simple vista (es decir, no comprende masas macrocelulares). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por mililitro a aproximadamente $3,75 \times 10^6$ células por mililitro. En una realización específica, dichas células se han criopreservado y descongelado. En otra realización específica, dichas células se han filtrado a través de un filtro de $70 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$. En otra realización específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 200 masas microcelulares (es decir, masas celulares visibles solo con aumento) por 10^6 células. En otra realización específica, la composición farmacéutica comprende menos de aproximadamente 150 masas microcelulares por 10^6 células. En otra realización específica, la composición farmacéutica comprende menos de aproximadamente 100 masas microcelulares por 10^6 células. En otra realización específica, la composición farmacéutica comprende un porcentaje de DMSO menor de 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% o 2% o menor de 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% o 0,1%.

40

45

50

Además, en la presente memoria, se proporcionan composiciones que comprenden células madre placentarias, en donde dichas composiciones se producen mediante uno de los métodos descritos en dicha memoria. Por ejemplo, en una realización, la composición farmacéutica comprende células, por ejemplo, células madre placentarias, en donde la composición farmacéutica se produce mediante un método que comprende filtrar una solución que comprende células, por ejemplo, células madre placentarias, para formar una solución que contiene células filtradas; diluir la solución que contiene células filtradas con una primera solución a aproximadamente de 1 a 50×10^6 , de 1 a 40×10^6 , de 1 a 30×10^6 , de 1 a 20×10^6 , de 1 a 15×10^6 o de 1 a 10×10^6 células por mililitro, por ejemplo, antes de la criopreservación; y diluir la solución resultante que contiene células filtradas con una segunda solución que comprende dextrano, pero que no comprende albúmina de suero humano (HSA), para producir dicha composición. En determinadas realizaciones, dicha dilución no es mayor que aproximadamente 15×10^6 células por mililitro. En determinadas realizaciones, dicha dilución no es mayor que aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro. En determinadas realizaciones, dicha dilución no es mayor que aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células por

55

60

mililitro. En otras realizaciones determinadas, si antes de la dilución, la solución que contiene células filtradas comprende menos de aproximadamente 15×10^6 células por mililitro, la filtración es opcional. En otras realizaciones determinadas, si antes de la dilución la solución que contiene células filtradas comprende menos de aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro, la filtración es opcional. En otras realizaciones determinadas, si antes de la dilución la solución que contiene células filtradas comprende menos de aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células por mililitro, la filtración es opcional.

En una realización específica, las células, por ejemplo, células madre placentarias, se crioconservan entre dicha dilución con una primera solución de dilución y dicha dilución con dicha segunda solución de dilución. En otra realización específica, la primera solución de dilución comprende dextrano y HSA. El dextrano en la primera solución de dilución o en la segunda solución de dilución puede ser dextrano de cualquier peso molecular, por ejemplo, dextrano que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 150 kDa. En algunas realizaciones, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución, o en dicha segunda solución, es dextrano a aproximadamente 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0 %, 8,5%, 9,0%, 9,5% o 10%. En otra realización específica, el dextrano en dicha primera solución de dilución, o en dicha segunda solución de dilución, es dextrano-40. En otra realización específica, el dextrano en dicha primera solución de dilución y en dicha segunda solución de dilución es dextrano-40. En otra realización específica, dicho dextrano-40 en dicha primera solución de dilución es dextrano-40 al 5,0%. En otra realización específica, dicho dextrano-40 en dicha primera solución de dilución es dextrano-40 al 5,5%. En otra realización específica, dicho dextrano-40 en dicha segunda solución de dilución es dextrano-40 al 10%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA del 1 a 15%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA con un porcentaje de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA al 10%. En otra realización específica, dicha primera solución de dilución comprende HSA. En otra realización específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA al 10%. En otra realización específica, dicha primera solución de dilución comprende un crioprotector. En otra realización específica, dicho crioprotector es DMSO. En otra realización específica, dicho dextrano 40 en dicha segunda solución de dilución es dextrano-40 a aproximadamente 10%. En otra realización específica, dicha composición que comprende células comprende dextrano de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9%. En otra realización específica, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro a aproximadamente $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células por mililitro. En otra realización específica, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por mililitro a aproximadamente $3,75 \times 10^6$ células por mililitro.

En otra realización, la composición farmacéutica se prepara mediante un método que comprende (a) filtrar una solución que contiene células que comprende células madre placentarias antes de la crioconservación, para producir una solución que contiene células filtradas; (b) crioconservar las células en la solución que contiene células filtradas a aproximadamente de 1 a 50×10^6 , de 1 a 40×10^6 , de 1 a 30×10^6 , de 1 a 20×10^6 , de 1 a 15×10^6 , o de 1 a 10×10^6 células por mililitro; (c) descongelar las células; y (d) diluir con una solución de dextrano-40, la solución que contiene las células filtradas de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:11 (v/v). En determinadas realizaciones, si el número de células es menor que aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro antes de la etapa (a), la filtración es opcional. En otra realización específica, las células en la etapa (b) se crioconservan a aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro. En otra realización específica, las células en la etapa (b) se crioconservan en una solución que comprende un porcentaje de dextrano-40 y HSA de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%. En determinadas realizaciones, dicha dilución en la etapa (b) no es mayor que aproximadamente 15×10^6 células por mililitro.

En otra realización, la composición farmacéutica se prepara mediante un método que comprende: (a) suspender células madre placentarias en una solución de dextrano-40 al 5,5% que comprende HSA al 10% para formar una solución que contiene células; (b) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 μ M; (c) diluir la solución que contiene células con una solución que comprende dextrano-40 al 5,5%, HSA al 10% y DMSO al 5%, a aproximadamente de 1 a 50×10^6 , de 1 a 40×10^6 , de 1 a 30×10^6 , de 1 a 20×10^6 , de 1 a 15×10^6 o de 1 a 10×10^6 células por mililitro; (d) crioconservar las células; (e) descongelar las células; y (f) diluir con dextrano-40 al 10% la solución que contiene células a una proporción de 1:1 a 1:11 (v/v). En determinadas realizaciones, dicha dilución en la etapa (c) no es mayor que aproximadamente 15×10^6 células por mililitro. En determinadas realizaciones, dicha dilución en la etapa (c) no es mayor que aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células/ml. En determinadas realizaciones, dicha dilución en la etapa (c) no es mayor que aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células/ml.

En otra realización, la composición que comprende las células se prepara mediante un método que comprende: (a) centrifugar una pluralidad de células, por ejemplo, células madre placentarias, para recoger las células; (b) resuspender las células en dextrano-40 al 5,5%; (c) centrifugar las células para recoger las células; (d) resuspender las células en una solución de dextrano-40 al 5,5% que comprende HSA al 10%; (e) filtrar las células a través de un filtro de 70 μ M; (f) diluir las células en dextrano-40 al 5,5%, HSA al 10% y DMSO al 5% a aproximadamente de 1 a 50×10^6 , de 1 a 40×10^6 , de 1 a 30×10^6 , de 1 a 20×10^6 , de 1 a 15×10^6 o de 1 a 10×10^6 células por mililitro; (g) crioconservar las células; (h) descongelar las células; y (i) diluir las células de 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano-40 al 10%. En determinadas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) no es mayor que aproximadamente 15×10^6 células por mililitro. En determinadas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) no es mayor que aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células / ml. En determinadas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f)

no es mayor que aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células / ml. En otras realizaciones determinadas, si el número de células es menor que aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro, la filtración es opcional.

Se pueden utilizar otras formulaciones inyectables, adecuadas para la administración de productos celulares.

5 Las composiciones farmacéuticas útiles en la presente invención pueden comprender cualquiera de las células madre placentarias descritas en la presente memoria, por ejemplo, como se describe en la Sección 5.2.2 anterior, útil en la invención. En una realización, la composición farmacéutica comprende células madre placentarias aisladas que son sustancialmente, o completamente, de origen no materno, es decir, tienen el genotipo fetal; por ejemplo, al menos aproximadamente el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o aproximadamente el 100% son de origen no materno. En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica comprende una población de células madre placentarias aisladas que son, CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ y CD200⁺. En otros ejemplos, las células son CD200⁺ y HLA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺ y CD200⁺; CD200⁺ y OCT-4⁺; o CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻; o una combinación de lo anterior, en donde al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de dichas células madre placentarias aisladas son de origen no materno. En otra realización, una composición farmacéutica comprende una población de células madre placentarias aisladas que son CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ y CD34⁻; CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ y al menos una de CD90⁺ o CD45⁻; CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁺ y CD45⁻; CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ y CD45⁻. En otros ejemplos las células son CD200⁺ y HLA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺ y CD200⁺; CD200⁺ y OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻; o una o más de CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻, CD80⁻, CD86⁻, HLA-A,B,C⁺, HLA-DP, DQ, DR- y/o PDL1⁺; o una combinación de lo anterior, en donde al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de dichas células madre placentarias aisladas son de origen no materno. En una realización específica, la composición farmacéutica comprende adicionalmente una célula madre que no se obtiene de una placenta.

Las células madre placentarias aisladas en las composiciones, por ejemplo, en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria, pueden comprender células madre placentarias obtenidas de un solo donante o de varios donantes. Las células madre placentarias aisladas pueden ser completamente compatibles, o parcial o completamente incompatibles, con el HLA de un receptor destinatario.

25 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender además BM-MS. En determinadas realizaciones, las células madre placentarias y las BM-MS están presentes en la composición farmacéutica en una proporción, por ejemplo, de 99:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50 : 50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95 o 1 : 99 por número de células o entre 99:1 y 95:5, entre 95:5 y 90:10, entre 90:10 y 85:15, entre 85:15 y 80:20, entre 80:20 y 75:25, entre 75:25 y 70:30, entre 70:30 y 65:35, entre 65:35 y 60:40, entre 60:40 y 55:45, entre 55:45 y 50:50, entre 50:50 y 45:55. entre 45:55 y 40:60, entre 40:60 y 35:65, entre 35:65 y 30:70, entre 30:70 y 25:75, entre 25:75 y 20:80, entre 20:80 y 15:85, entre 10:90 y 5:95, o entre 5:95 y 1:99, por número de células.

5.6.4 Matrices que comprenden células madre placentarias aisladas

35 Además, en la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden matrices, hidrogeles, armazones, y estructuras similares, que comprenden células madre placentarias. Dichas composiciones pueden utilizarse en lugar de, o además de, células en suspensión líquida. En determinadas realizaciones, las células madre placentarias aisladas se combinan con plasma rico en plaquetas. En otras realizaciones, las células madre placentarias aisladas se combinan con alginato.

40 Las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria, pueden sembrarse en una matriz natural, por ejemplo, en un biomaterial placentario tal como un material de membrana amniótica. Dicho material de membrana amniótica puede ser, p. ej., una membrana amniótica desecada directamente de una placenta de mamífero; una membrana amniótica fijada o tratada térmicamente, una membrana amniótica sustancialmente deshidratada (es decir, con un porcentaje de H₂O <20%), una membrana coriónica, una membrana coriónica sustancialmente deshidratada, una membrana amniótica y coriónica sustancialmente deshidratada, y similares. En 45 Hariri, Publicación de solicitud de Estados Unidos N° 2004/0048796 se describen biomateriales placentarios preferidos en los que pueden sembrarse células madre placentarias aisladas.

Las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria pueden suspenderse en una solución de hidrogel adecuada, por ejemplo, para inyección. Los hidrogeles adecuados para dichas composiciones incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD16. En una realización, se puede permitir que una solución de hidrogel 50 que comprende las células se endurezca, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tenga células dispersas en su interior para su implantación. Las células madre placentarias aisladas en dicha matriz también se pueden cultivar para que las células se expandan por mitosis antes de la implantación. El hidrogel es, por ejemplo, un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno, para crear una estructura reticular tridimensional abierta que atrapa las moléculas de agua para formar un gel. Los 55 materiales formadores de hidrogel incluyen polisacáridos, tales como alginato y sus sales, péptidos, polifosfazinas y poliácridatos, que están reticulados iónicamente, o polímeros en bloque, tales como copolímeros en bloque de poli(óxido de etileno) y polipropilenglicol que están reticulados por temperatura o pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o la matriz es biodegradable.

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

5 En algunas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas, o soluciones acuosas de alcohol, que tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Son ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que se pueden hacer reaccionar con cationes los poli(fosfazenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), los copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, el poli(acetato de vinilo) y los polímeros sulfonados, tales como como el poliestireno sulfonado. También se pueden utilizar copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por
10 reacción de monómeros o polímeros de ácido acrílico o ácido metacrílico y vinil éter. Son ejemplos de grupos ácidos los grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos alcohólicos halogenados (preferiblemente fluorados), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.

15 Las células madre placentarias aisladas descritas en esta memoria o cocultivos de las mismas, pueden sembrarse en una estructura o armazón tridimensional e implantarse *in vivo*. Dicha estructura se puede implantar en combinación con uno o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que, p. ej., estimulan la formación de tejido.

20 Como ejemplos de armazones que se pueden utilizar se incluyen alfombrillas no tejidas, espumas porosas o péptidos autoensamblables. Las alfombrillas no tejidas pueden formarse utilizando fibras que comprenden un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (por ejemplo, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Como armazones también se pueden utilizar espumas, compuestas, por ejemplo, por copolímero de poli(ϵ -caprolactona)/ poli(ácido glicólico) (PCL / PGA), formado por procesos tales como criodesecación o liofilización (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.355.699).

25 En otra realización, las células madre placentarias aisladas se pueden sembrar sobre un fieltro o ponerse en contacto con el mismo, que puede estar compuesto, por ejemplo, por un hilo de multifilamento fabricado con un material bioabsorbible, tal como copolímeros de PGA, PLA, PCL o combinaciones, o ácido hialurónico.

30 En otra realización, las células madre placentarias aisladas proporcionadas en esta memoria pueden sembrarse en armazones de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Dichos armazones de espuma se pueden moldear para adoptar una forma útil, tal como una porción de una estructura específica, por ejemplo, un hueso que contiene una lesión. En algunas realizaciones, el armazón se trata, por ejemplo, con ácido acético 0,1 M seguido de incubación en polilisina, PBS y / o colágeno, antes de la inoculación de las células para mejorar la adhesión celular. Las superficies externas de una matriz pueden modificarse para mejorar la adhesión o el crecimiento de las células y la diferenciación de los tejidos, como por recubrimiento de plasma de la matriz o la adición de una o más proteínas (p. ej., colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glucoproteínas, glucosaminoglucanos (por ejemplo, sulfato de heparina, sulfato de condroitina-4, sulfato de condroitina-6, sulfato de dermatán, sulfato de queratina, etc.)
35 una matriz celular y/u otros materiales tales como, pero sin limitación, gelatina, alginatos, agar, agarosa, gomas vegetales y similares.

40 En algunas realizaciones, el armazón comprende, o se trata con, materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y mantener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de la matriz extracelular. Como ejemplos de estos materiales y tratamientos se incluyen, pero sin g/ml limitación, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal, tales como laminina y colágeno de tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE y siliconas de poliuretano urea segmentadas, tales como PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, California). El armazón también puede comprender agentes antitrombóticos tales como heparina; los armazones también pueden tratarse para alterar la carga superficial (p. ej., recubriendo con plasma) antes de la siembra con células madre placentarias aisladas.

45 Las células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria también pueden sembrarse sobre un material cerámico fisiológicamente aceptable, o ponerse en contacto con él, que incluye, pero sin limitación, mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri- y tetra- fosfato de calcio, hidroxiapatita, fluoroapatites, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de calcio magnesio, vidrio biológicamente activos, tal como BIOGLASS® y mezclas de estos. Materiales cerámicos biocompatibles porosos, actualmente disponibles en el
50 comercio incluyen, SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canadá), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Suiza), y productos de injerto óseo de colágeno mineralizado, tales como HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITOSS®, RHAKOSS™ y CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). El armazón puede ser una mezcla, una combinación o un compuesto de materiales naturales y/o sintéticos.

55 En una realización, sobre un armazón adecuado se siembran, o se ponen en contacto con el mismo, de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ a aproximadamente 8×10^6 células madre placentarias aisladas/ml.

5.7 LÍNEAS DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS INMORTALIZADAS

Las células madre placentarias útiles en el tratamiento de un cáncer relacionado con hueso, en la supresión de la proliferación de células cancerosas relacionadas con hueso o en la supresión de la maduración de progenitores de

osteoclastos, pueden immortalizarse condicionalmente por transfección con cualquier vector adecuado que contenga un gen promotor del crecimiento, es decir, un gen que codifique una proteína que, en condiciones apropiadas, promueva el crecimiento de la célula transfectada, de tal manera que la producción y / o la actividad de la proteína promotora del crecimiento pueda regularse mediante un factor externo. En una realización preferida, el gen promotor del crecimiento es un oncogén tal como, pero sin limitación, v-myc, N-myc, c-myc, p53, antígeno T grande del SV40, antígeno T grande del poliovirus, adenovirus E1a o proteína E7 del virus del papiloma humano.

La regulación externa de la proteína promotora del crecimiento se puede realizar colocando el gen promotor del crecimiento bajo el control de un promotor que puede regularse mediante un factor externo, por ejemplo, un promotor cuya actividad se puede controlar, por ejemplo, modificando la temperatura de las células transfectadas o la composición del medio en contacto con las células. En una realización, se puede emplear un sistema de expresión génica controlado por tetraciclina (tet) (véase Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551, 1992; Hoshimaru et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1518-1523, 1996). En ausencia de tet, un transactivador controlado con tet (tTA) dentro de este vector, activa fuertemente la transcripción de $ph_{CMV^{-1}}$, un promotor mínimo del citomegalovirus humano fusionado a secuencias del operador tet. tTA es una proteína de fusión del represor (tetR) del operón de resistencia a tet derivado del transposón 10 de *Escherichia coli* y el dominio ácido de VP16 del virus del herpes simple. Concentraciones bajas, no tóxicas (por ejemplo, 0,01 -1,0 $\mu\text{g/ml}$) de tet, anulan casi por completo la transactivación por tTA.

En una realización, el vector contiene además un gen que codifica un marcador de selección, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia a los fármacos. El gen bacteriano que confiere resistencia a la neomicina (neo^R) es uno de los marcadores que se puede emplear dentro de los métodos actuales. Las células que llevan neo^R pueden seleccionarse por medios conocidos por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, la adición de G418 100-200 $\mu\text{g/ml}$ al medio de crecimiento.

La transfección puede realizarse mediante cualquiera de una variedad de medios conocidos por los expertos en la materia, incluyendo pero sin limitación, infección retroviral. En general, un cultivo celular se puede transfectar por incubación con una mezcla de medio acondicionado recogido de la línea celular productora para el vector y DMEM/F12 que contiene complemento de N2. Por ejemplo, un cultivo de células madre placentarias preparado como se describe anteriormente, puede infectarse después, por ejemplo, cinco días *in vitro* por incubación durante aproximadamente 20 horas en un volumen de medio acondicionado y dos volúmenes de DMEM F12 que contiene complemento de N2. Las células transfectadas que llevan un marcador de selección pueden seleccionarse como se describe anteriormente.

Después de la transfección, las células se pasan a una superficie que permite la proliferación, por ejemplo, permite que al menos el 30% de las células se duplique en un período de 24 horas. Preferiblemente, el sustrato es un sustrato de polioritina / laminina, que consiste en un plástico de cultivo tisular recubierto con polioritina (10 $\mu\text{g/ml}$) y / o laminina (10 $\mu\text{g/ml}$), un sustrato de polilisina / laminina o una superficie tratada con fibronectina. Los cultivos se alimentan cada 3-4 días con medio de crecimiento, que puede complementarse o no con uno o más factores potenciadores de la proliferación. Los factores potenciadores de la proliferación pueden añadirse al medio de crecimiento cuando los cultivos alcanzan una confluencia menor de 50%.

Las líneas de células madre placentarias condicionalmente immortalizadas pueden someterse a pases utilizando técnicas convencionales, tal como mediante tripsinización, cuando alcanzan una confluencia de 80-95%. Hasta aproximadamente el vigésimo pase es, en algunas realizaciones, beneficioso para mantener la selección (por ejemplo, por adición de G418 para las células que contienen un gen que confiere resistencia a la neomicina). Las células también pueden congelarse en nitrógeno líquido para su almacenamiento prolongado.

Las líneas celulares clonales pueden aislarse de una línea de células madre de placenta humana condicionalmente immortalizadas preparadas como se describió anteriormente. En general, dichas líneas celulares clonales se pueden aislar utilizando técnicas convencionales, tales como por dilución límite o utilizando anillos de clonación, y se expanden. Las líneas celulares clonales pueden alimentarse y someterse a pases en general como se describe anteriormente.

Las líneas de células madre placentarias humanas condicionalmente immortalizadas, que pueden ser, pero no necesariamente, clonales, pueden inducirse generalmente para diferenciarse al suprimir la producción y / o la actividad de la proteína promotora del crecimiento en condiciones de cultivo que facilitan diferenciación. Por ejemplo, si el gen que codifica la proteína promotora del crecimiento está bajo el control de un promotor regulable mediante un factor externo, las condiciones, por ejemplo, la temperatura o la composición del medio, pueden modificarse para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. Para el sistema de expresión génica controlado por tetraciclina descrito anteriormente, la diferenciación puede realizarse mediante la adición de tetraciclina para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. En general, 1 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina durante 4-5 días es suficiente para iniciar la diferenciación. Para promover una mayor diferenciación, se pueden incluir agentes adicionales en el medio de crecimiento.

Las BM-MSc también pueden immortalizarse utilizando cualquiera de los métodos anteriores.

5.8 Kits

5 En otro aspecto, en la presente memoria se describen kits, adecuados para el tratamiento de un individuo que tiene un cáncer relacionado con hueso, por ejemplo, mieloma múltiple o condrosarcoma, o uno de los otros cánceres relacionados con hueso enumerados en cualquier otra parte de este documento, que comprende, en un recipiente separado del resto del contenido del kit, células madre placentarias adherentes a plástico de cultivo tisular, por ejemplo, las células madre placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2, anterior y / o células madre mesenquimatosas de médula ósea aisladas, e instrucciones de uso. Preferiblemente, las células madre placentarias y / o BM-MSC se proporcionan en una solución farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución adecuada para administración intralesional o una solución adecuada para administración intravenosa.

10 Los kits pueden comprender uno o más componentes que facilitan el suministro de las células madre placentarias y / o BM-MSC al individuo. Por ejemplo, el kit comprende componentes que facilitan el suministro intralesional de las células al individuo. En dichos casos, el kit puede comprender, por ejemplo, jeringas y agujas, adecuadas para el suministro de las células al individuo, y similares. En dichos casos, las células madre placentarias pueden estar contenidas en el kit en una bolsa, o en uno o más viales. En otros casos determinados, el kit comprende
15 componentes que facilitan el suministro intravenoso o intraarterial de las células placentarias al individuo. En dichos casos, las células madre placentarias pueden estar contenidas, por ejemplo, en un frasco o en una bolsa (por ejemplo, una bolsa de sangre o una bolsa similar, que puede contener una solución, que contiene las células, de hasta aproximadamente 1,5 l).

20 Además, el kit puede comprender uno o más compuestos que reducen el dolor o la inflamación en el individuo (por ejemplo, un analgésico, un compuesto antiinflamatorio esteroideo o no esteroideo, o similar). El kit también puede comprender un compuesto antibacteriano o antivírico (ej., uno o más antibióticos), un compuesto para reducir la ansiedad en el individuo (por ejemplo, alaprazolam), un compuesto que reduce la respuesta inmunitaria en el individuo (p. ej., ciclosporina A), un antihistamínico (difenhidramina, loratadina, desloratadina, quetiapina, fexofenadina, cetirizina, prometazina, clorepirenamina, levocetirizina, cimetidina, famotidina, ranitidina, nizatidina, roxatidina, lafutidina, o similares).
25

Adicionalmente, el kit puede comprender productos desechables, por ejemplo, toallitas estériles, productos de papel desechables, guantes o similares, que facilitan la preparación del individuo para el suministro, o que reducen la probabilidad de infección en el individuo como resultado de la administración de las células madre placentarias.

6. Ejemplos

30 6.1 EJEMPLO 1: LAS CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS PROMUEVEN LA FORMACIÓN DE HUESO

IN VIVO

Este ejemplo demuestra la capacidad de las células madre placentarias aisladas adherentes a plástico de cultivo tisular para promover la formación de hueso.

35 Las células madre placentarias se obtuvieron de la siguiente manera. En resumen, se obtuvo tejido placentario que media aproximadamente 1 x 2 x 1 cm y se trituró en trozos de aproximadamente 1 mm³. Estos trozos se digirieron con colagenasa IA (2 mg / ml, Sigma) durante 30 minutos, seguido de digestión con tripsina-EDTA (0,25%, GIBCO BRL) durante 10 minutos, a 37 °C en un baño con agua. La solución resultante se centrifugó a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido por la eliminación de la solución de digestión. El sedimento se resuspendió a aproximadamente 10 volúmenes con PBS, y se centrifugó a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento tisular/celular se resuspendió en 130 ml de medio de cultivo, y las células se sembraron a 13
40 ml por matraz T-75 recubierto con fibronectina. Las células se incubaron a 37 °C con una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Las células utilizadas en los estudios descritos en esta memoria, y en los siguientes Ejemplos, se cultivaron en el pase 6 antes de su uso. Dichas células madre placentarias aisladas son generalmente CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺. El análisis con anticuerpos contra CD44 y CD90 mostró además que las células eran
45 CD34⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺.

Las ratas utilizadas en este estudio tenían aproximadamente 6 semanas de vida en el momento del estudio, y se asignaron 16 ratas a cada grupo. Se crearon defectos craneales bilaterales (izquierda y derecha; aproximadamente 3 mm x 5 mm) en 96 ratas macho atímicas Hsd:RH-Foxn^{nu} (Charles River, Wilmington, Massachusetts). En resumen, en la zona craneal central entre las orejas se realizó una incisión cutánea transversal y se colocó un expansor tisular en la región central del margen rostral de la incisión (colgajo cutáneo). El expansor abrió la incisión y expuso el cráneo. Después de realizar la incisión el periostio se retiró de los huesos parietales. Los lugares de los defectos se marcaron y se utilizó un torno Dremel a velocidad media para esculpir cuidadosamente el margen de ambos defectos, de aproximadamente 3 mm por 5 mm de área, en cada hueso parietal. Los bordes del defecto se comprobaron y se suavizaron cuidadosamente utilizando pinzas si fuese necesario. Una vez limpio y retirado el
50 exceso de líquido, el defecto se trató por vía intralesional, como se describe a continuación. Después, se retiró la dermis sobre el cráneo y se cerró la incisión dérmica con sutura.

Los grupos de tratamiento fueron los siguientes. Se reparó un defecto por rata con HEALOS® (matriz biomimética

similar a una esponja que comprende colágeno reticulado e hidroxiapatita; DuPuy Spine, Inc., Raynham, Massachusetts) sembrado con células madre placentarias (5×10^6 células en 500 μ l), células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (BM-MS; obtenidas de aspirado de médula ósea reciente (AllCells, Emeryville, California)) (5×10^6 células en 500 μ l), HEALOS® solo como control negativo, o HEALOS® complementado con proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) (5 μ g por explante) como control positivo. En otras ratas de control negativo, el defecto no se reparó. El defecto restante en cada rata se reparó utilizando solo HEALOS®.

Tres semanas después de la implantación, las ratas que recibieron HEALOS® + BMP-2, HEALOS® + células madre placentarias y HEALOS® + BM-MS mostraron aproximadamente el mismo nivel de curación, y una curación significativamente mayor del defecto craneal que las ratas que recibieron solo HEALOS®, o que no recibieron tratamiento de reparación. Véase la Figura 1.

Por lo tanto, las PDAC tienen la capacidad de promover la curación de lesiones óseas, un síntoma de progresión del mieloma múltiple.

6.2 EJEMPLO 2: LAS CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS SUPRIMEN LA MADURACIÓN DE OSTEOCLASTOS

Este ejemplo demuestra que las células madre placentarias adherentes a plástico (PDAC) de cultivo tisular inhiben la maduración de precursores de osteoclastos. La supresión de precursores de osteoclastos proporcionaría un beneficio a los pacientes con mieloma múltiple que padecen lesiones óseas (y síntomas acompañantes) causados por la sobreproducción de osteoclastos inducida por mieloma.

En placas de 24 pocillos, se prepararon precursores de osteoclastos humanos, obtenidos por enriquecimiento de células CD14⁺ de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), utilizando un kit de selección positiva a CD14 EASYSEP® Human (N° de cat. 18058) y se cultivaron en medio MEM complementado con factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y Ligando Receptor del Activador del Factor Nuclear κ B (RANKL; véase Yaccoby et al, Cancer Research 64 (6): 2016-2023 (2004)). Se cultivaron células madre placentarias, aisladas como se describe en el Ejemplo 1, o células madre mesenquimatosas (MSC) fetales, con precursores de osteoclastos en condiciones sin contacto, sembrando las células en sistemas TRANSWELL® 1 μ m (COSTAR®; CORNING®, Nueva York) (10.000 células/TRANSWELL®) y cultivando conjuntamente las células madre placentarias o MSC con los precursores de osteoclastos durante 5-6 días. Al final del cultivo, los sistemas TRANSWELL® se retiraron y se examinaron los precursores de osteoclastos y/o los osteoclastos para verificar la apoptosis con tinción de anexina V y yoduro de propidio (PI) utilizando un kit de anexina V/PI (Caltag Labs., Burlingame, California). La anexina V se une a la fosfatidilserina, que durante la apoptosis se transporta desde la lámina interna hasta la lámina externa de la membrana plasmática; las células con membranas plasmáticas intactas no admiten el yoduro de propidio. Por lo tanto, las células que son positivas para la tinción de anexina pero no para la tinción de PI son células apoptóticas tempranas; las células que son positivas para la tinción tanto de anexina como de PI son células apoptóticas tardías.

Se descubrió que las células madre placentarias inducían significativamente la apoptosis y reducían la viabilidad de los precursores de osteoclastos en comparación con los controles en los que se cultivaron células de mieloma múltiples sin células madre placentarias, como se muestra mediante un aumento de tinción de anexina V y yoduro de propidio.

Las células en los sistemas TRANSWELL® se fijaron con formalina y se tiñeron para fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP; un marcador de osteoclastos). En cada pocillo se realizó un recuento del número de osteoclastos multinucleados que expresaban TRAP. Las células madre placentarias aisladas como se describe en el Ejemplo 1, inhibieron la diferenciación de los osteoclastos, como lo indica una disminución de la tinción de TRAP en cortes histológicos y una disminución significativa ($p < 0,05$) en el número de osteoclastos positivos a TRAP (Figura 2).

Por lo tanto, las células madre placentarias no solo pueden reparar las lesiones óseas, sino que también pueden reducir el número y la actividad de los osteoclastos que crearían o contribuirían a dichas lesiones.

6.3 EJEMPLO 3: LAS CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS INHIBEN EL CRECIMIENTO DE CELULAS DE MYELOMA MÚLTIPLE

Este ejemplo demuestra que las células madre placentarias adherentes a plástico de cultivo tisular (PDAC) tienen la capacidad de suprimir la proliferación de células de mieloma múltiple tanto *in vitro* como *in vivo*.

6.3.1 Supresión con PDAC de la proliferación de células de mieloma múltiple *in vitro*

Se establecieron líneas celulares de mieloma múltiple humano BN, JB, DNC y HLE (véase Li et al, Br. J. Haematol. 138 (6): 802-11 (2007)) y ARP1 en el Instituto de Investigación y Terapia de Mieloma en la Universidad de Ciencias Médicas de Arkansas. La línea celular de mieloma múltiple U266 (Nilsson et al., Clin. Exp. Immunol. 7: 477 (1970)) se obtuvo en la colección americana de cultivos tipo. Estas líneas celulares se transfectaron con una construcción lentivírica de luciferasa/GFP mediante métodos establecidos (véase Li et al, citado anteriormente) para facilitar el seguimiento y el análisis del crecimiento tumoral en presencia de células madre placentarias en condiciones de contacto entre células. Las líneas celulares BN, JB y DNC son dependientes de estroma. En placas

de 96 pocillos se cultivaron células madre placentarias, MSC fetales (FB-MS) y MSC generadas a partir de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple (Pt-MS) a aproximadamente 10.000 células/pocillo). Se cultivaron conjuntamente células de mieloma múltiple (10.000 células / pocillo) con células madre placentarias o MSC durante una semana en medio RPMI complementado con FBS al 10% y antibióticos. Al final del cultivo, el crecimiento de las células de mieloma múltiple pudo determinarse midiendo la actividad luciferasa.

Los resultados de este estudio se resumen en la Figura 3, que muestra el factor de crecimiento de células de mieloma múltiple en presencia de células madre placentarias en comparación con el crecimiento en presencia de FB-MS y Pt-MS. El crecimiento de células de mieloma múltiple en presencia de células madre placentarias, varió dependiendo de la línea celular particular, pero el crecimiento de cada línea celular fue significativamente menor para líneas celulares cultivadas conjuntamente con células madre placentarias que para líneas celulares cultivadas conjuntamente con MSC fetales o MSC de paciente con mieloma múltiple.

También se indujeron las MSC y las células madre placentarias aisladas como se describe en el Ejemplo 1, a diferenciarse en osteoblastos mediante incubación con DMEM/suero bovino fetal (FBS) al 10% acondicionado con factores de osteogénesis osteoblásticos (por ejemplo, ácido ascórbico, beta glicerofosfato y dexametasona) durante aproximadamente 3-3,5 semanas (véase Yaccoby et al, Haematologica 91 (2): 192-199 (2006)). Para ensayar los efectos sobre el crecimiento de las líneas celulares de mieloma múltiple, las placas se lavaron con PBS para eliminar los factores osteoblásticos. El crecimiento de las células de mieloma múltiple en cocultivo con osteoblastos generados a partir de FB-MS o Pt-MS se redujo en comparación con el crecimiento de células de mieloma múltiple en cocultivo con FB-MS o Pt-MS. La diferenciación de células madre placentarias en osteoblastos no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de líneas celulares de mieloma múltiple, o lo redujo ligeramente, en comparación con el cocultivo con células madre placentarias. El experimento se repitió 3 veces para la mayoría de las líneas celulares.

Para estudiar el posible efecto del contacto entre células, las células se cultivaron en un sistema en donde se impedía el contacto entre células. En particular, las MSC (FB-MS o BM-MS), o células madre placentarias aisladas como se describe en el Ejemplo 1, se cultivaron en un sistema TRANSWELL® en el lado posterior de membranas TRANSWELL® de 24 pocillos, mientras que las células plasmáticas de mieloma múltiple se cultivaron en la cámara superior del TRANSWELL®. Véase la Figura 4. Se aislaron células primarias de mieloma múltiple de 6 pacientes utilizando separación con perlas inmunomagnéticas CD138 y durante 6-10 días se cultivaron conjuntamente a 500.000 células de mieloma múltiple pocillo con MSC o células madre placentarias (100.000 células/TRANSWELL®). CD138 es un marcador de células plasmáticas.

Los efectos de los cocultivos sobre la viabilidad de células de mieloma múltiple, se determinaron mediante exclusión con azul de tripano y mediante un ensayo con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). El ensayo con MTT es un ensayo colorimétrico que mide la actividad de enzimas que reducen MTT a formazán, dando lugar a un color púrpura. Esta reducción se produce solo cuando las enzimas reductasas mitocondriales están activas y, por lo tanto, la conversión se usa a menudo como una medida de células viables. En un experimento, las células de mieloma múltiple también se sometieron a análisis de flujo con anexina V/PI, como se describe en el Ejemplo 2 anterior. La supervivencia de las células primarias de mieloma múltiple se redujo en el co-cultivo TRANSWELL® con células madre placentarias en comparación con la supervivencia en el co-cultivo TRANSWELL® con MSC fetales, para células de mieloma de la mayoría de los pacientes evaluados. Véase la figura 5.

6.3.2 Supresión de células de mieloma múltiple con células madre placentarias

Proliferación y aumento de la masa ósea *in vivo*

El vector retroviral pLEGFP, que contenía una secuencia codificante de la Proteína Verde Fluorescente Mejorada (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*) (Clontech, Palo Alto, California, EE. UU.) se utilizó para transfectar transitoriamente la línea celular de empaquetamiento Phoenix Eco (ecotrófica) utilizando SuperFect (QIAGEN Inc., Valencia, California, EE. UU.). La EGFP es una variante de la proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* de tipo silvestre que cambia a color rojo, que se ha optimizado para una fluorescencia más brillante y una expresión más alta en células de mamífero. Los sobrenadantes que contenían partículas retrovirales se recogieron 24-48 horas después de la transfección. Para facilitar el seguimiento, las células madre placentarias se infectaron con las partículas retrovirales en presencia de polibreno 8 µg/ml durante 12 horas, momento en el cual los medios se reemplazaron por medio de cultivo reciente. En algunos experimentos, las células se expusieron a los sobrenadantes que contenían las partículas retrovirales una vez más antes de seleccionarse cultivándolas en presencia de 200-400 µg/ml de G418 durante 2-3 semanas.

Como alternativa al uso de tejido óseo humano en un modelo SCID-hu de mieloma primario humano, se utilizó un sistema en donde se implantaron huesos de conejo en ratones SCID (ratones SCID-rab), seguido de la introducción de células de mieloma directamente en el hueso implantado. Se construyeron ratones SCID-rab mielomatosos como se describió anteriormente. Véase Yata, K. y Yaccoby, S. et al., Leukemia 2004; 18: 1891-1897. Se obtuvieron ratones CB.17/1cr-SCID (de 6 a 8 semanas de vida) de Harlan Sprague Dawley (Indianápolis, IN, EE. UU.) y conejos preñados de Nueva Zelanda de Myrtle Rabbitry (Thompson Station, TN, EE. UU.). Los conejos de 3 - 4 semanas de vida fueron profundamente anestesiados con una dosis alta de pentobarbital sódico y se sacrificaron por dislocación

cervical. El fémur y la tibia del conejo se cortaron en dos trozos, con los extremos proximal y distal cerrados, mientras que las vértebras se cortaron en pequeños fragmentos (1 x 2 cm²).

5 Para la implantación de los huesos, el lado derecho o izquierdo del ratón SCID se lavó con alcohol y se secó con una gasa estéril. El hueso del conejo se insertó por vía subcutánea a través de una pequeña incisión (5 mm). Después, la incisión se cerró con grapas quirúrgicas estériles y se permitió el injerto de los huesos durante 6-8 semanas. En algunos ratones experimentales, se implantaron dos huesos simultáneamente a cada lado en el mismo ratón. Para cada experimento, se inyectaron 10 - 50 x 10⁶ células de médula ósea de mieloma procedentes de
10 pacientes humanos no separadas que contenían 17 +/- 8% de células plasmáticas (PC) o 3,3 +/- 1,6 x 10⁶ PC en 50 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) directamente en el hueso de conejo implantado. Se utilizaron al menos dos ratones para cada experimento. Para medir los cambios producidos en los niveles de inmunoglobulina (Ig) humana circulante del isotipo proteína M, periódicamente se extrajo sangre de la vena de la cola de los ratones.

15 El establecimiento del crecimiento del mieloma se demostró mediante niveles incrementados de inmunoglobulinas monoclonales humanas (hlg) en sueros de ratón, tal como se observó mediante ensayo ELISA, y mediante evaluación radiográfica de lesiones óseas líticas. Antes de la transformación se recogieron 5x10⁵ células madre placentarias que expresaban EGFP, aisladas como se describe en el Ejemplo 1, utilizando tripsina-EDTA y se resuspendieron en 50 µl de PBS. Las células madre placentarias se inyectaron directamente en los huesos implantados en los ratones SCID-rab. Los experimentos continuaron durante 8-16 semanas después de la inyección. Los cambios en la densidad mineral ósea (BMD, *Bone Mineral Density*) de los huesos implantados se
20 determinaron utilizando un densitómetro PIXImus DEXA (GE Medical Systems LUNAR, Madison, WI). El efecto de las células madre placentarias sobre la proliferación de células de mieloma múltiple se determinó rastreando los niveles de inmunoglobulinas monoclonales humanas (hlg) en sueros de ratón, tal como se observó mediante ensayo ELISA.

25 Se descubrió que las células de mieloma múltiple de un paciente (denominado Paciente 1) crecían en ratones SCID-rab/SCID-hu, y podían pasarse a ratones SCID-rab/SCID-hu recién creados; sin embargo, no fueron capaces de crecer de manera independiente o en la capa del estroma *in vitro*. A seis ratones SCID-rab, injertados satisfactoriamente con las células de mieloma múltiple, se les administró células madre placentarias transfectadas por vía intralesional, y a seis se les administró un control (solución salina tamponada con fosfato).

30 Se descubrió que el crecimiento de células de mieloma múltiple se inhibía significativamente después de dos y cuatro semanas de inyección de células madre placentarias, pero no de PBS, mediante detección de inmunoglobulinas monoclonales humanas (hlg) en sueros de los ratones, como se observó mediante ensayo ELISA (p<0,007; Figura 6). El análisis de bioluminiscencia en animales vivos detectó células madre placentarias que expresan luciferasa en estos ratones; la intensidad de la bioluminiscencia a los 14 días se redujo en todos los ratones a los que se les administró células madre placentarias (Tabla 1 B). Además, los rayos X tomados antes de la
35 administración de células madre placentarias y 4 semanas después del tratamiento revelaron un aumento de la masa ósea después de la inyección de células madre placentarias en huesos mielomatosos, aunque la masa ósea disminuyó en los huesos tratados con PBS como control (Figura 7).

Tabla 1B: Resultados de ensayos de bioluminiscencia en animales vivos – número de recuentos por animal.

Ratón	1	2	3	4	5
3 días	5,20 x 10 ⁶	6,50 x 10 ⁶	8,3 x 10 ⁶	2,30 x 10 ⁷	3,30 x 10 ⁶
14 días	2,68 x 10 ⁴	ND	2,80 x 10 ⁵	1,10 x 10 ⁶	2,00 x 10 ⁴

40 Para ensayar el efecto de las células madre placentarias sobre la densidad de masa ósea de hueso no mielomatoso, células madre placentarias (1 x 10⁶ células / ratón) o vehículo se inyectaron directamente en los huesos no mielomatosos implantados en ratones SCID-rab. La inyección de las células madre placentarias, pero no del vehículo, dio como resultado un notable aumento de la BMD del hueso implantado desde niveles de pretratamiento. Estos datos indican que la inyección directa de células madre placentarias en hueso mielomatoso o
45 no mielomatoso da lugar a un aumento de la masa ósea local y que el aumento de la formación de hueso por las células madre placentarias se asociaba a una carga de mieloma reducida.

A continuación, utilizamos células de mieloma de un segundo paciente, denominado Paciente 2, que se clasificaban molecularmente como un subtipo MMSET de alto riesgo (asociado a mieloma múltiple agresivo y a un mal pronóstico) y que expresaban un nivel moderado de DKK1. Las células de mieloma del paciente 2 no crecieron en cultivo, pero se pasaron con éxito en el modelo SCID-rab descrito anteriormente. El tratamiento se inició cuando el
50 crecimiento del mieloma estaba bien establecido y las lesiones osteolíticas eran evidentes. Las células madre placentarias se inyectaron por vía intralesional en el hueso implantado (0,1 a 1 x 10⁶ células madre placentarias / hueso, 7 huéspedes / grupo) o por vía subcutánea, utilizando un transportador de hidrogel HyStem-C (5 x

10⁶ células madre placentarias / ratón, 6 ratones). Analizada 4 semanas después del tratamiento, la inyección intralesional de 0,5 y 1 x 10⁶ células madre placentarias dieron como resultado un aumento de la BMD de los huesos implantados a partir de niveles de pretratamiento (p<0,01) o la prevención de la pérdida de hueso en comparación con el grupo control (p <0,02) (Figura 8). El aumento de la masa ósea mediante inyección de 1 x 10⁶ células madre placentarias se asoció adicionalmente a un crecimiento reducido del mieloma a un nivel casi significativo (p <0,08, Figura 9).

También se comparó el efecto de las células madre placentarias y las MSC fetales humanas en la enfermedad ósea del mieloma y el crecimiento tumoral. Las células se inyectaron (1 x 10⁶ células / ratón) directamente en los huesos implantados de ratones SCID-rab injertados con células de mieloma del paciente 2 (7 hospedadores / grupo). El tratamiento con células madre placentarias y MSC dio como resultado un aumento de la BMD del hueso implantado en comparación con el nivel de pretratamiento, sin embargo, el efecto de las células madre placentarias fue más intenso (Figura 10). El tratamiento tanto con células madre placentarias como con MSC inhibió significativamente el crecimiento de células de mieloma del paciente n. ° 2 en el modelo SCID-rab (Figura 11). Estos resultados sugieren que, si bien tanto las MSC como las células madre placentarias son eficaces aumentando la BMD de huesos afectados por mieloma, las células madre placentarias tienen un mayor potencial anabólico óseo que las MSC fetales.

Por lo tanto, este ejemplo demuestra que las células madre placentarias pueden reducir significativamente la viabilidad de células de mieloma múltiple, particularmente cuando se administran por vía intralesional en individuos mielomatosos. Las células madre placentarias también reducen la viabilidad de células de mieloma múltiple in vitro en condiciones que permiten el contacto entre células, y en condiciones que impiden el contacto entre células. Junto con la capacidad de las células madre placentarias para reparar el hueso, p. ej., lesiones óseas que son sintomáticas de mieloma múltiple, e inhibir la maduración de los osteoclastos, una de las principales causas del desarrollo de lesiones óseas relacionadas con el mieloma múltiple, estos resultados indican que las células madre placentarias pueden ser un tratamiento terapéutico útil contra el mieloma múltiple.

6.4 EJEMPLO 4: LAS CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS PROMUEVEN LA DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR DEL MIELOMA MÚLTIPLE

Este Ejemplo demuestra que las células madre placentarias adherentes a plástico de cultivo tisular (PDAC) suprimen el crecimiento de células de mieloma múltiple.

6.4.1 Las células madre placentarias suprimen la proliferación de células de mieloma múltiple

Para estudiar el efecto de las células madre placentarias SOBRE el crecimiento de células de mieloma múltiple, las células madre placentarias, aisladas como se describe en el Ejemplo 1, se cocultivaron con 6 líneas celulares de mieloma múltiple (MMCL), denominadas U-266 (*American Type Culture Collection (ATCC) N° de Catálogo TIB-196*), RPMI-8226 (ATCC N° de Catálogo CCL-155), L-363 (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) N° de catálogo ACC49*), H929 (Gazdar, *Blood 67: 1542-1549 (1986)*), LP-1 (*DSMZ N° de Catálogo ACC41*) y OPM-2 (*DSMZ N° de Catálogo ACC -50*). Las cuatro líneas celulares de mieloma múltiple seleccionadas para estos experimentos representan la heterogeneidad de las células de mieloma múltiple, como se aprecia por diferencias en la producción de inmunoglobulinas (véase la Tabla 2) y las diferencias en la expresión del marcador celular (véanse las Tablas 3A-3C).

Tabla 2: Producción de tipos de inmunoglobulina por líneas celulares de mieloma múltiple.

Línea celular	IgA	IgG	Cadena Kappa	Cadena Lambda
H-929	0,0	0,1	98,9	0,9
OPM-2	0,6	0,1	3,5	97,3
RPMI-8226	0,0	0,0	0,9	85,8
U266	0,0	0,1	1,2	99,5

Tablas 3A-3C: marcadores celulares expresados por líneas celulares de mieloma múltiple (expresados como porcentaje de células que expresan un marcador).

Tabla 3A.

Muestra	CD38 ⁺	CD56 ⁺	CD19 ⁺	CD45 ⁺	CD11b ⁺	CD40 ⁺	CD138 ⁺
H929	97,7	98,6	0,74	2,3	7,56	0,18	72,9
OPM-2	13,2	21,2	0,062	0,21	56,9	0,14	7,33
RPMI-8226	96,7	64,4	0,093	0,3	29,4	18,3	16,7
U266	4,39	3,39	0,64	91,5	2,51	0,84	16,6

Tabla 3B.

Línea celular	CD58 ⁺	CXCR4 (CD184) ⁺	CD44 ⁺	CD49e (VLA5) ⁺	CD117 ⁺	CD20 ⁺
H929	99,8	0,65	99,7	51,1	27,1	0,54
OPM-2	29	8,14	21,2	0,35	0,53	0,31
RPMI-8226	95,8	4,2	6,48	67,6	7,73	0,057
U266	100	83,5	48,3	0,55	0,28	1,21

5 Tabla 3C.

Línea celular	CD33 ⁺	CD54 ⁺	CD28 ⁺	CD49d (VLA4) ⁺	CD106 ⁺	CD11a ⁺
H929	0,76	99,2	95,3	99,6	0,2	12,4
OPM-2	0,2	1,01	2,44	0,059	0,2	0,1
RPMI-8226	26,2	99,9	99,7	2,75	6,39	46,5
U266	6,83	100	99,9	99,5	0,58	5,77

10 Células madre placentarias de pase 6, aisladas como se describe en el Ejemplo 1, se descongelaron con DMEM + suero bovino fetal (FCS, *fetal calf serum*) al 10%. En cada pocillo de placas de 24 pocillos, se sembraron 5×10^4 células madre placentarias. Después de que las células madre placentarias crecieron hasta la confluencia, con un cambio de medio de una sola vez, en cada pocillo se sembraron 5×10^4 células MMCL en la parte superior de las células madre placentarias y se incubaron durante 4-5 días a una temperatura de 37 °C con CO₂ al 5%. Las células MMCL se recogieron los días 1, 2 y 5 del cultivo para su posterior análisis. Utilizando el sistema EASYCOUNT™ (Immunicon) se efectuó el recuento de las células.

15 Los resultados indicaron que las células madre placentarias alcanzaron una inhibición significativa del crecimiento de las líneas celulares de mieloma múltiple U266 ($p < 0,001$ el día 5 de cocultivo), RPMI-8226 ($p < 0,03$ el día 5 del cocultivo), H929 ($p < 0,003$ el día 4 del cocultivo) y OPM-2 ($p < 0,01$ el día 5 del cocultivo), en comparación con estas células de mieloma múltiple cultivadas solas. Véase la Figura 12. En experimentos distintos, el cocultivo de células L-363 con células madre placentarias dio como resultado una inhibición sustancial del crecimiento ($p < 0,06$ el día 5 del cocultivo) y el cocultivo de células LP-1 con células madre placentarias también dio como resultado la inhibición del crecimiento.

20

6.4.2 Las células madre placentarias regulan negativamente la expresión de células de mieloma múltiple de genes que codifican proteínas que desempeñan funciones clave en la señalización de NF-κB y en la activación de linfocitos B

- 5 Para caracterizar adicionalmente la inhibición del crecimiento de las células madre placentarias sobre las líneas celulares de mieloma múltiple, las células madre placentarias, aisladas como se describe en el Ejemplo 1, se cocultivaron con células U-266, RPMI-8226, OPM-2 y H929 durante 4 días, después, con una pipeta, se recogieron cuidadosamente células de mieloma múltiple cocultivadas con células madre placentarias, o células de mieloma múltiple cultivadas solas, sin alterar las células madre placentarias seguido de preparación de ARN y análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). La qRT-PCR se realizó utilizando tarjetas microfluídicas de 384 pocillos (TAQMAN® Custom Array, Applied Biosystems), que permiten realizar reacciones simultáneas de PCR en tiempo real. Las tarjetas contenían 300 genes involucrados en la regulación del ciclo celular, el crecimiento y la proliferación celular y la respuesta inmunitaria hormonal, incluidos los genes involucrados en la señalización de células B y en la señalización de NF-κB. La qRT-PCR se realizó utilizando el sistema de PCR en tiempo real 7900HT Fast (Applied Biosystems), y los datos se analizaron utilizando el programa informático REALTIME STATMINER®.
- 10
- 15 El cocultivo con las células madre placentarias reguló negativamente, de manera significativa, genes que codificaban los componentes clave de la activación de linfocitos B, incluidos TRAF1 (factor 1 asociado al receptor de TNF), TRAF6, y genes que codificaban componentes clave de la ruta de señalización de NF-κB, incluyendo TIRAP (*Toll-Interleukin 1 Receptor TIR domain containing Adaptor Protein*, proteína adaptadora que contiene dominio TIR Receptor de Toll-Interleucina 1); p65/RelA y RelB. Véase más adelante la tabla 4.
- 20 La proteína DKK1, una proteína producida por células de mieloma múltiple, inhibe la actividad de osteoblastos y propicia el equilibrio entre osteoblastos y osteoclastos a favor de la reabsorción ósea. Después del cocultivo con células madre placentarias, como se indicó anteriormente, la expresión de DKK1 en células OPM-2 también se reguló negativamente. Véase la Tabla 4.

- 25 Tabla 4. Factor de cambio de la expresión génica en células OPM-2 cocultivadas con células madre placentarias en comparación solo con OPM-2. Se calculó la desviación típica de las medias del factor de cambio de 2 repeticiones.

Gen	Factor de cambio	DESVTIP
DKK1	0,34	0,09
RELA	0,72	0,03
RELB	0,27	0,08
TIRAP	0,49	0,05
TRAF1	0,44	0,07
TRAF6	0,50	0,12

DESVTIP: Desviación Típica

6.4.3 Las células madre placentarias regulan negativamente la expresión de células de mieloma múltiple de genes que codifican Ciclinas y CDK, y regulan positivamente genes que codifican inhibidores de CDK

- 30 Se analizó el efecto de las células madre placentarias (PDAC), aisladas como se describe en el Ejemplo 1, sobre la expresión de ciclinas (CCN) y quinasas dependientes de ciclina (CDK) mediante qRT-PCR utilizando tarjetas microfluídicas de 384 pocillos que contenían genes involucrados en la regulación del ciclo celular, como se describió anteriormente, y se analizaron utilizando Ingenuity Pathways Analysis (INGENUITY® Systems, www.ingenuity.com). Se descubrió que las células madre placentarias disminuían la expresión en las líneas celulares de mieloma múltiple de los genes que codificaban determinadas CCN y CDK, y que aumentaban la expresión de genes para determinados inhibidores de CDK de una manera específica del tipo celular. Por ejemplo, en la línea celular de mieloma múltiple OPM-2, las CDK CDK3, CDK5 y CDK7 estaban reguladas negativamente; en las líneas celulares de mieloma múltiple RPMI-8226 y U-266, la CDK4 estaba regulada negativamente. Por el contrario, en la línea celular de mieloma múltiple OPM-2, los inhibidores de CDK, p16 y p19, y el inhibidor de CDK3 estaban regulados positivamente; en la línea celular de mieloma múltiple RPMI-8226, el inhibidor de CDK, p19 estaba regulado positivamente; en la línea celular de mieloma múltiple U266, p21 estaba regulado positivamente; y en la línea celular de mieloma múltiple H929, p19, p21 y p27 estaban regulados positivamente.
- 35
- 40

A continuación, en las Tablas 5A-5D, se presenta un resumen de los cambios en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular.

- 45 Tablas 5A-5D. Factor de cambio de expresión génica en células de mieloma múltiple cocultivadas con células madre placentarias, en comparación con células de mieloma múltiple solo, para líneas celulares de mieloma múltiple OPM-

ES 2 646 750 T3

2, U-266, RPMI-8226 y H929. Se calculó la desviación típica de las medias del factor de cambio de 2 repeticiones.

Tabla 5A OPM-2

	Factor de cambio	DESVTIP
CCNB3	0,39	0,07
CCNC	0,63	0,02
CCND1	0,01	0,00
CDK3	0,82	0,05
CDK5	0,82	0,00
CDK7	0,73	0,05
CDKN2A(p16)	1,55	0,26
CDKN2D (p19)	1,61	0,25
CDKN3	4,41	0,27

Tabla 5B U-266

	Factor de cambio	DESVTIP
CCNB1	0,16	0,01
CCNB2	0,16	0,03
CCND1	0,23	0,01
CCND2	0,08	0,00
CDK4	0,38	0,01
CDKNIA (p21)	1,45	0,14
E2F3	0,80	0,02
E2F4	0,44	0,00
E2F5	0,30	0,00
E2F6	0,22	0,00

5

Tabla 5C RPMI-8226

	Factor de cambio	DESVTIP
CCNB1	0,61	0,03
CCNB2	0,82	0,14
CCND1	0,64	0,06
CCND2	0,68	0,05
CDK2AP1	0,56	0,02
CDK4	0,56	0,03
CDKN2D(p19)	1,41	0,13

	Factor de cambio	DESVTIP
E2F3	0,67	0,02
E2F4	0,75	0,10
E2F5	0,52	0,02
E2F6	0,63	0,07

Tabla 5D H929

	Factor de cambio	DESVTIP
CCNB1	0,52	0,03
CCNB2	0,71	0,07
CCNB3	0,54	0,37
CCNC	0,64	0,02
CDK10	0,40	0,00
CDK3	0,84	0,06
CDK5	0,83	0,09
CDK9	0,82	0,03
CDKN1A (p21)	3,71	0,99
CDKN1B (p27)	1,12	0,18
CDKN2D (p19)	1,18	0,08

5 Se descubrió que las células madre placentarias, aisladas como se describe en el Ejemplo 1, también disminuyeron la expresión en líneas celulares de mieloma múltiple de genes que codificaban los miembros 3, 4, 5 y 6 de la familia de E2F (proteínas que desempeñan un papel importante en la transición de la fase G₁ a la S) y Rb fosforilada (proteína del Retinoblastoma). Este hallazgo es significativo porque en el estado hipofosforilado, la proteína Rb actúa como supresor tumoral al inhibir los factores de la familia de E2F; sin embargo, la Rb fosforilada, apenas tiene función inhibidora en la progresión del ciclo celular.

10 Para investigar más a fondo el efecto de las células madre placentarias sobre la proliferación de células de mieloma múltiple, se analizó el estado de fosforilación de la proteína del Retinoblastoma (Rb) mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo monoclonal J146-35 (BD Pharmingen, n° de cat. 558549) y el anticuerpo monoclonal J112-906 (n° de cat. 558549, BD). El anticuerpo J146-35 reconoce la Rb fosforilada en la serina 780 (pS780), que afecta a la unión de Rb con E2F, y el anticuerpo J112-906 reconoce la Rb fosforilada en las serinas 807 y 811 (pS807/pS811), que regula la unión de c-Ab1 y la progresión del ciclo celular. H929, LP1 y OPM2 cocultivadas con las células madre placentarias mostraron disminución de la fosforilación de Rb en pS780 y en pS807/pS811, en relación con las células cultivadas solas. Véanse las Figuras 13A-13C.

20 El efecto de las células madre placentarias sobre la proliferación de líneas celulares de mieloma múltiple se ensayó adicionalmente utilizando los colorantes fluorescentes BrdU y 7-AAD utilizando un kit de flujo BrdU de APC (n° de catálogo 552598, BD biociencias). El co-cultivo con las células madre placentarias dio como resultado un porcentaje aumentado de células de mieloma múltiple en fase G₀/G₁, y un porcentaje disminuido de dichas células en fase S, para las líneas celulares RPMI-8226, OPM-2 y U266, en comparación con las células de mieloma múltiple cultivadas solas. Véase la tabla 6.

Tabla 6: Análisis celular de cocultivo de células madre placentarias: MMCL

25

	G0/G1	Fase S
H929	63,5	27,0
H929 + Células madre placentarias	53,9	28,9
RPMI-8226	45,3	11,6
RPMI-8226 + Células madre placentarias	64,9	9,9
OPM2	49,2	42,8
OPM2 + Células madre placentarias	78,4	11,5
U266	43,0	19,2
U266 + Células madre placentarias	65,9	9,3

5 Las células de mieloma múltiple secretan niveles aberrantemente elevados de inmunoglobulinas. Para estudiar el efecto de las células madre placentarias sobre la producción de inmunoglobulina por líneas celulares de mieloma múltiple, mediante citometría de flujo se analizó la producción de inmunoglobulina intracelular o superficial mediante MMCL cocultivadas con las células madre placentarias, o MMCL cultivadas solas. Se observó una disminución de la producción de inmunoglobulina en las líneas celulares de mieloma múltiple H929, OPM2 y LP1 cuando se cultivaron conjuntamente con las células madre placentarias en comparación con las células de mieloma múltiple cultivadas solas. Por ejemplo, las células H929 cocultivadas mostraron una disminución de la producción de inmunoglobulina Kappa (κ); las células OPM2 cocultivadas mostraron una disminución de la producción de inmunoglobulina Lambda (λ); y las células LP1 cocultivadas mostraron una disminución de la producción de inmunoglobulina Kappa intracelular y de la inmunoglobulina Lambda e IgG intracelular y superficial, en comparación con las células cuando se cultivaron solas. Véase la tabla 7.

10 Tabla 7. Cambio de media geométrica de producción de Ig en un sistema de cocultivo de células madre placentarias: MMCL

15

Línea celular	Ig	Localización	Día 1	Día 2	Día 4
H929	Kappa		-	N/A	-81,0 %
OPM2	Lambda		-	-4,2 %	-52,2 %
LP1	Lambda	superficie	-9,6 %	-17,9 %	-48,7 %
	Lambda	intracelular	-31,6 %	-16,5 %	-13,5 %
LP1	IgG	superficie	-7,3 %	-10,0 %	-36,4 %
	IgG	intracelular	-20,0 %	-21,3 %	-13,7 %
LP1	Kappa	intracelular	-15,1 %	-11,4 %	-13,4 %

Ig: tipo de inmunoglobulina

20 Los resultados anteriores que demuestran que las células madre placentarias reducen la proliferación de células de mieloma múltiple, no se debieron a un efecto general del cocultivo de células madre placentarias con otros tipos de células, sino que eran específicos de células de mieloma múltiple. Por ejemplo, se descubrió que las células madre placentarias aumentaban la expansión de células hematopoyéticas CD34⁺ cuando se cultivaban conjuntamente a tres proporciones diferentes (10:1, 1:1 y 1:10) durante 7 días.

25 Por lo tanto, los estudios anteriores demuestran que cuando las células madre placentarias se cocultivan con líneas celulares de mieloma múltiple, reducen la tasa de crecimiento de las células de mieloma múltiple, regulan negativamente la expresión de genes de líneas celulares de mieloma múltiple que codifican proteínas del ciclo celular necesarias para la progresión a través del ciclo celular, y regulan positivamente genes que codifican inhibidores de la progresión del ciclo celular. Como tales, las células madre placentarias serían útiles en la reducción de la proliferación de células de mieloma múltiple *in vivo*.

6.5 EJEMPLO 5: USO DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS PARA SUPRIMIR EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CONDROSARCOMA

Este ejemplo demuestra que las células madre placentarias (PDAC) suprimen la proliferación de células de condrosarcoma en cultivo.

- 5 Cultivo en TRANSWELL®: para examinar los efectos de las células madre placentarias, aisladas como se describe en el Ejemplo 1, sobre el crecimiento de células tumorales en un sistema de co-cultivo TRANSWELL®, se sembraron 1×10^4 o 5×10^4 PDAC en el cámara inferior del sistema TRANSWELL® en 600 μ l de medio de crecimiento y se sembraron 1×10^4 células de condrosarcoma (ATCC® No. CRL-7891; 400 μ l en medio de crecimiento) en la cámara superior del TRANS WELLS® (3 μ m de diámetro). Las células de condrosarcoma se cultivaron solas sin células madre placentarias como control. Todos los cocultivos del TRANSWELL® se colocaron en placas de 24 pocillos, y cada condición se configuró por triplicado. Después de 7 días de cultivo en una incubadora de cultivo celular a 37 °C y con CO₂ al 5%, las células de condrosarcoma, que estaban en la cámara superior, se examinaron utilizando un microscopio Leica.

- 15 El condrosarcoma es un cáncer caracterizado por la producción de una matriz cartilaginosa alrededor de las células tumorales. De acuerdo con esta sintomatología, en el experimento realizado en TRANSWELL®, las células de condrosarcoma crecieron como agregados diferenciados, claramente visibles al microscopio, en ausencia de células madre placentarias. En presencia de células madre placentarias, ensayadas ambas proporciones, se apreciaban menos células de condrosarcoma, y las células se caracterizaron por una ausencia completa de agregados celulares que caracterizaron el crecimiento solo de las células tumorales. Como tales, las células madre placentarias inhibieron claramente el crecimiento de las células de condrosarcoma.

6.6 EJEMPLO 6: INHIBICIÓN DE LA OSTEOCLASTOGÉNESIS UTILIZANDO LENALIDOMIDA

Este ejemplo demuestra que la lenalidomida de molécula pequeña (comercializada con el nombre REVLIMID®; 3-(4-amino-1-oxo 1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il) piperidin-2,6-diona) se puede utilizar para suprimir la osteoclastogénesis.

- 25 La lenalidomida tiene un intenso efecto antiosteoclastogénico a concentraciones de aproximadamente 1 μ M, generando una fuerte disminución en el número de osteoclastos formados (Figura 14). Cuando precursores de osteoclastos cultivados con las células madre placentarias, aisladas como se indica en el Ejemplo 1, y lenalidomida 0,1 μ M o 1 μ M, se compararon con osteoclastos cultivados con células madre placentarias o con células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (BM-MSC), se descubrió que la lenalidomida disminuía adicionalmente el número de osteoclastos que se diferenciaban de los precursores de osteoclastos. Figura 15. Por lo tanto, hay un posible efecto antiosteoclastogénico sinérgico o aditivo de las PDAC y la lenalidomida a una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ M y 1 μ M.

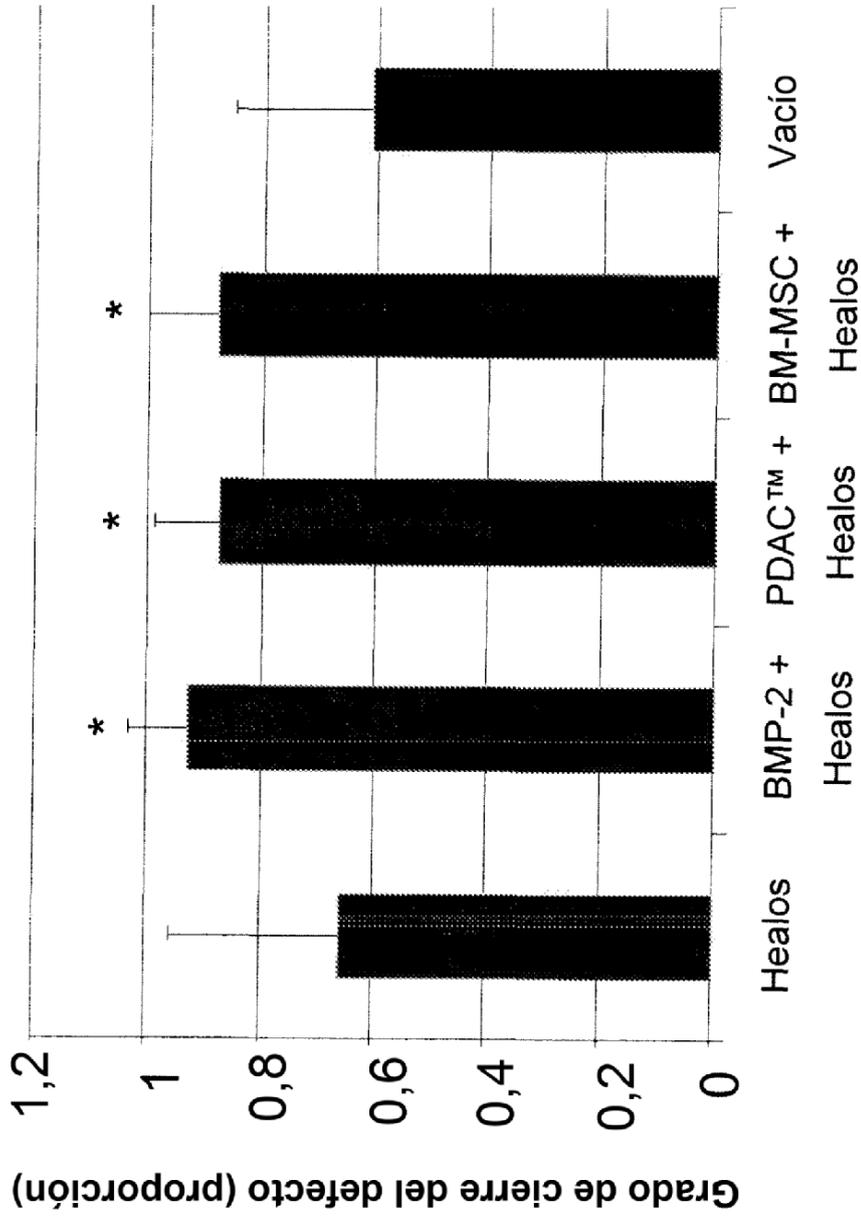
Por lo tanto, tanto la lenalidomida sola como la lenalidomida en combinación con células madre placentarias, son eficaces para reducir el número de precursores de osteoclastos y, por lo tanto, deben ser terapéuticos para reducir el número y/o la gravedad de lesiones óseas asociadas a un cáncer relacionado con hueso, tal como mieloma múltiple.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Células madre placentarias aisladas para su uso en un método para la supresión de la proliferación de células de un cáncer relacionado con hueso en un individuo humano, en donde el método consiste en poner en contacto dichas células de un cáncer relacionado con hueso, con una pluralidad de células madre placentarias, durante un tiempo suficiente para que dichas células madre placentarias supriman la proliferación de dichas células de un cáncer relacionado con hueso, en comparación con una pluralidad de dichas células de un cáncer relacionado con hueso que no se han puesto en contacto con células madre placentarias,
- 10 en donde dichas células de un cáncer relacionado con hueso son células de condrosarcoma, células de cáncer de hueso, células de neuroblastoma, células de osteosarcoma, células de sarcoma de Ewing, células de cordoma, células de un histiocitoma fibroso maligno de hueso, o células de un fibrosarcoma de hueso,
- en donde dichas células madre placentarias son adherentes a plástico de cultivo tisular, son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo, y no son trofoblastos, citotrofoblastos o células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.
- 15 2. Las células madre placentarias aisladas para el uso de la reivindicación 1, en donde dichas placentarias son CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺; o CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo.
- 20 3. Las células madre placentarias aisladas para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha puesta en contacto comprende la administración de al menos 1×10^8 de dichas células madre placentarias a dicho individuo humano.
4. Las células madre placentarias aisladas para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha puesta en contacto comprende la administración de dichas células madre placentarias a dicho individuo humano en, o adyacente a, una lesión ósea causada por dicho cáncer relacionado con hueso.
- 25 5. Las células madre placentarias aisladas para el uso de la reivindicación 1, en donde dichas células placentarias suprimen al menos un 50 % la proliferación de dichas células de un cáncer relacionado con hueso en comparación con la proliferación de un número equivalente de células de dicho cáncer relacionado con hueso en ausencia de dichas células placentarias.
- 30 6. Células madre placentarias aisladas para su uso en un método para el tratamiento de un individuo humano que tiene un cáncer relacionado con hueso, en donde el método consiste en la administración a dicho individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias durante un tiempo suficiente para que dichas células madre placentarias mejoren uno o más síntomas de, o reduzcan la progresión de, dicho cáncer relacionado con hueso,
- en donde dicho cáncer relacionado con hueso es condrosarcoma, cáncer de hueso, neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, cordoma, histiocitoma fibroso maligno de hueso o fibrosarcoma de hueso,
- 35 en donde dichas células madre placentarias son adherentes a plástico de cultivo tisular, son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo, no son trofoblastos, citotrofoblastos o células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, y tienen la capacidad de diferenciarse en células osteogénicas o condrogénicas.
- 40 7. Las células madre placentarias aisladas para el uso de la reivindicación 6, en donde dichas células madre placentarias son CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺; o CD34⁻, CD45⁻, CD10⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺, como puede detectarse por citometría de flujo.
- 45 8. Las células madre placentarias aisladas para el uso de la reivindicación 6, en donde dichas células madre placentarias se administran a dicho individuo humano por vía intravenosa, o en, o adyacente a, una lesión ósea causada por dicho cáncer relacionado con hueso.
9. Las células madre placentarias aisladas para el uso de la reivindicación 8, que comprende la administración de al menos 1×10^8 células placentarias a dicho individuo humano.

10. Las células madre placentarias aisladas para el uso de la reivindicación 8, en donde dichas células placentarias suprimen al menos un 50 % la proliferación de células de dicho cáncer relacionado con hueso en comparación con la proliferación de un número equivalente de células de dicho cáncer relacionado con hueso en ausencia de dichas células placentarias.



* $p < 0,05$ en comparación con Healos

FIG. 1

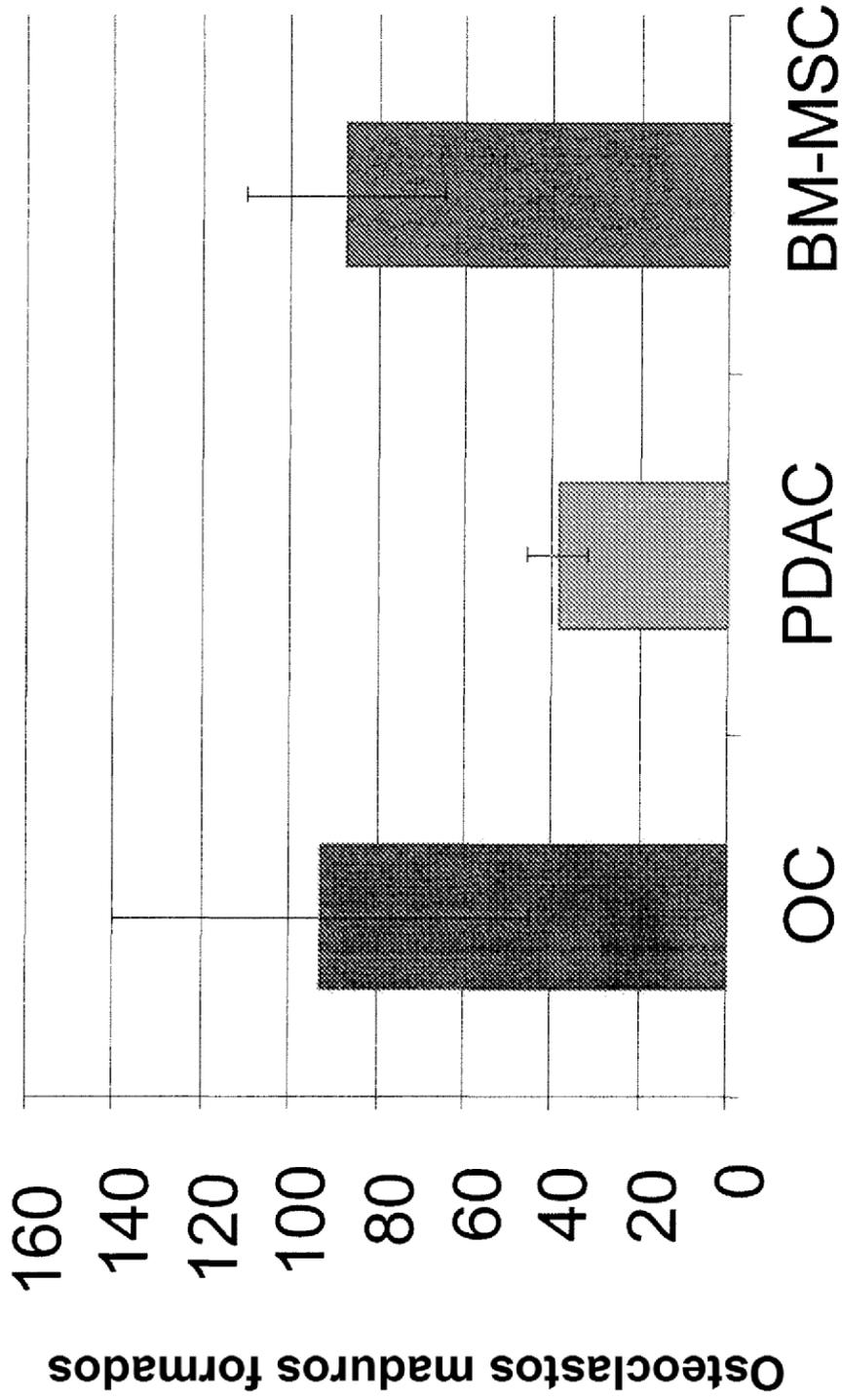


FIG. 2

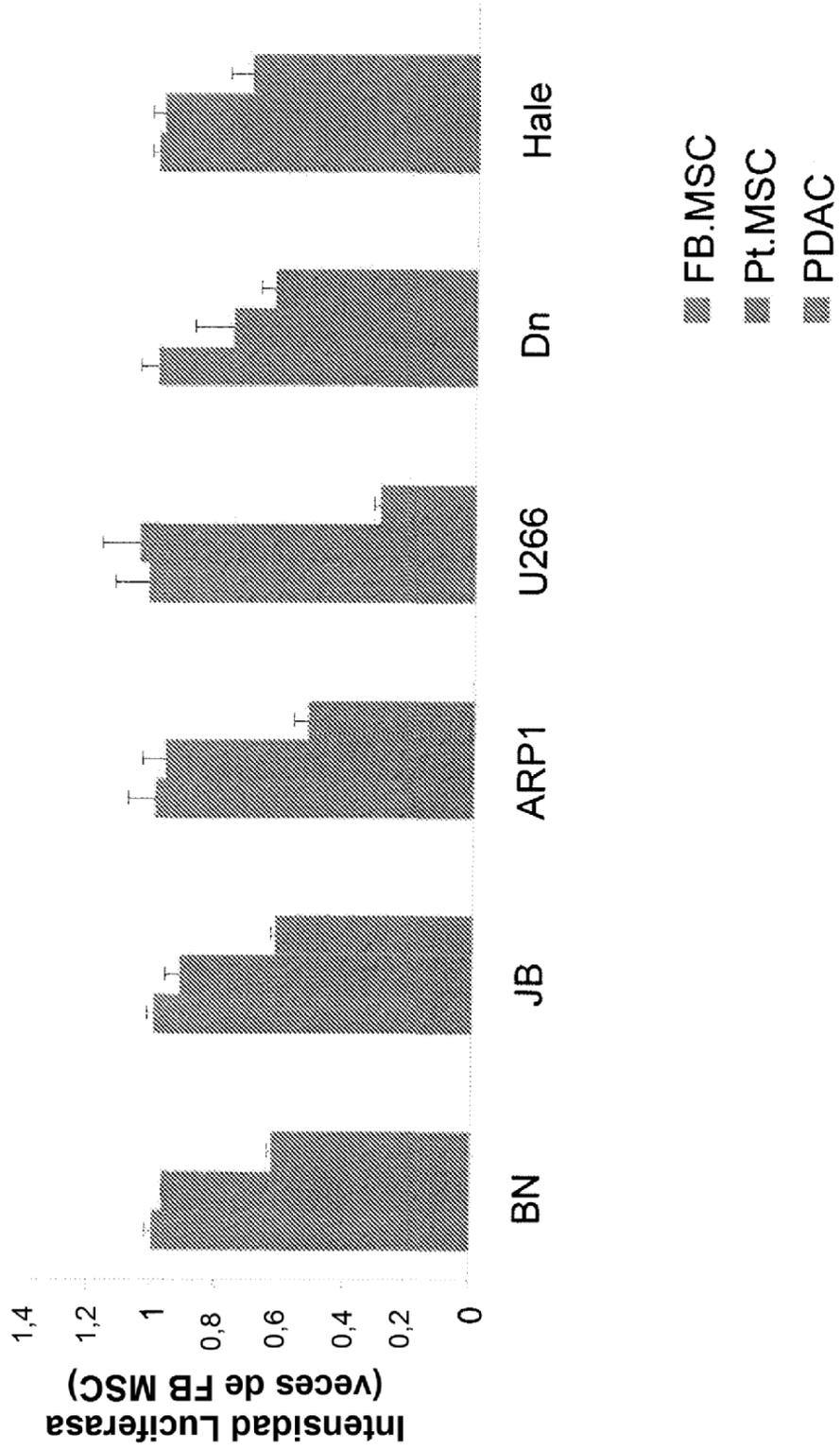


FIG. 3

Células de Mieloma múltiple

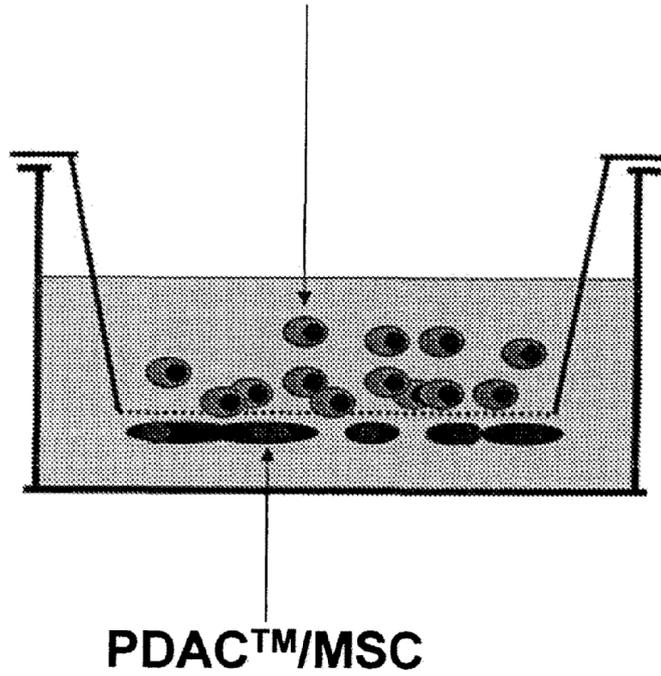


FIG. 4

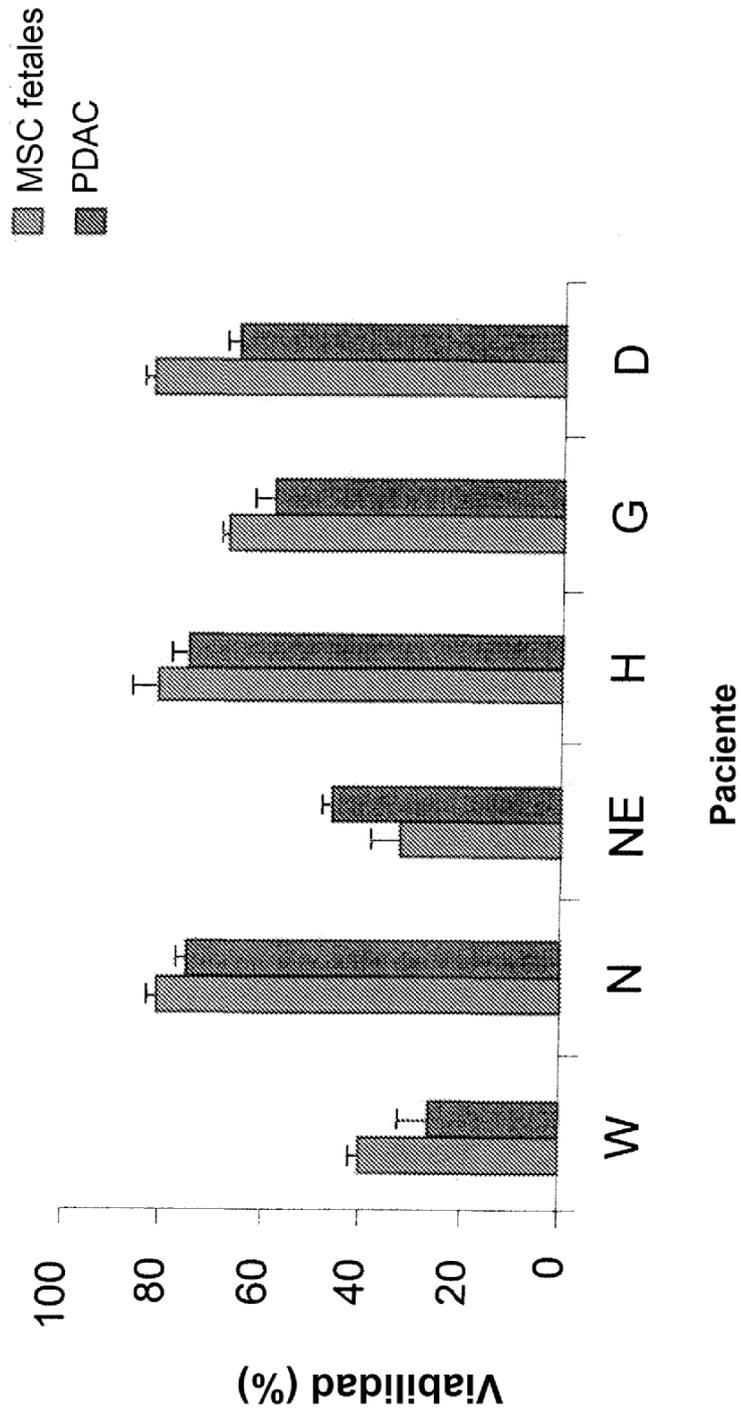


FIG. 5

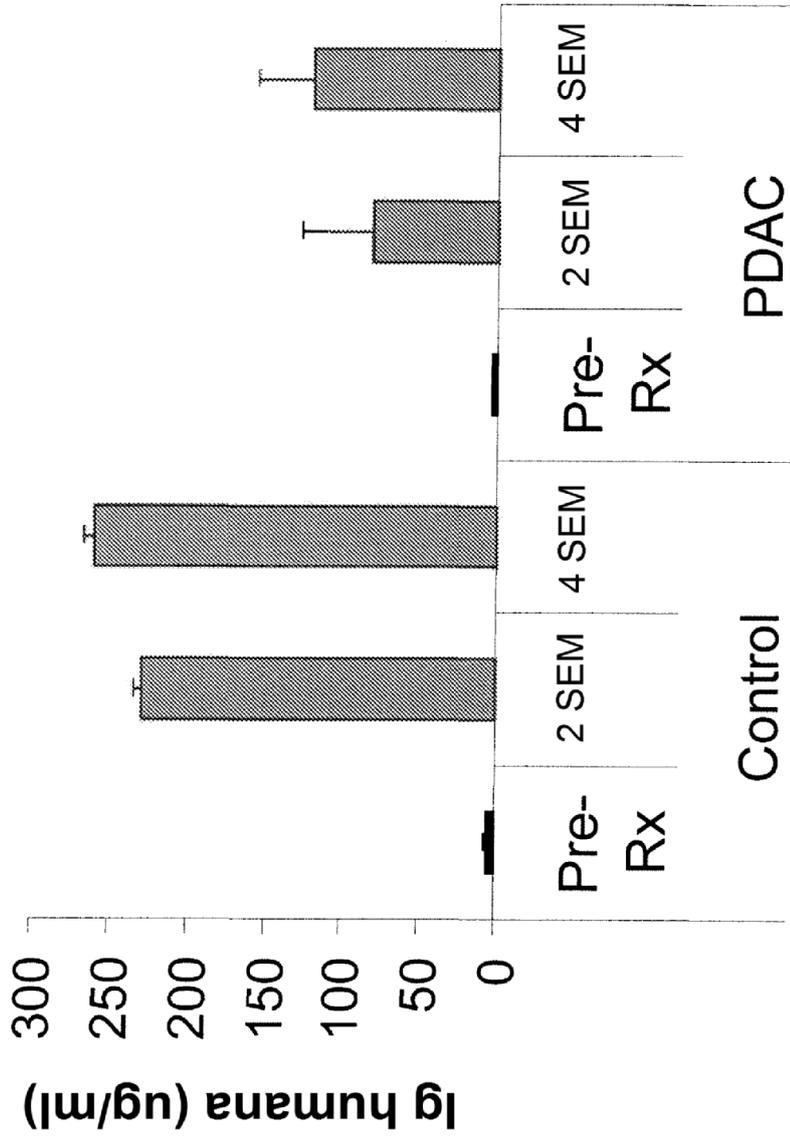


FIG. 6

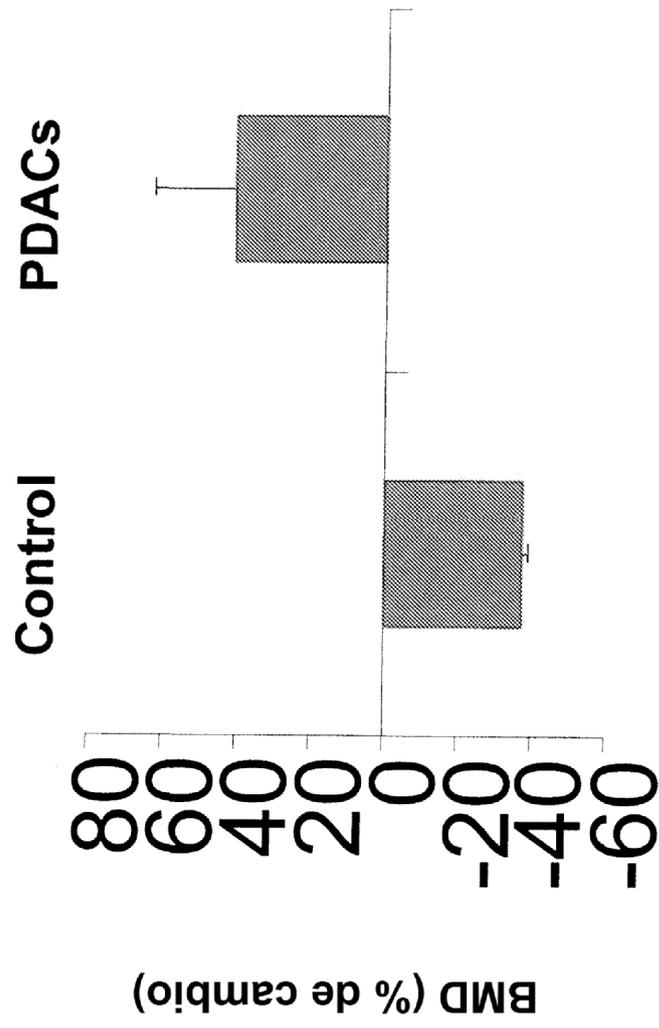


FIG. 7

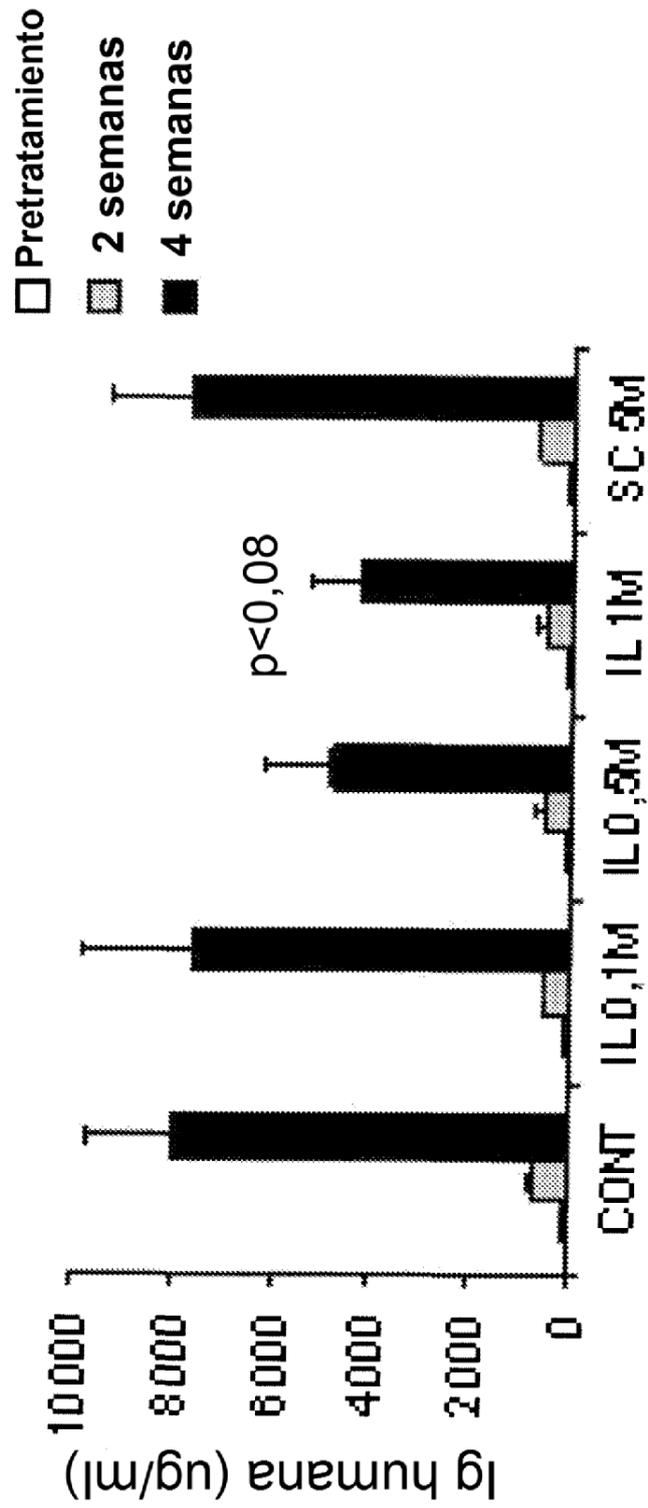


FIG. 8

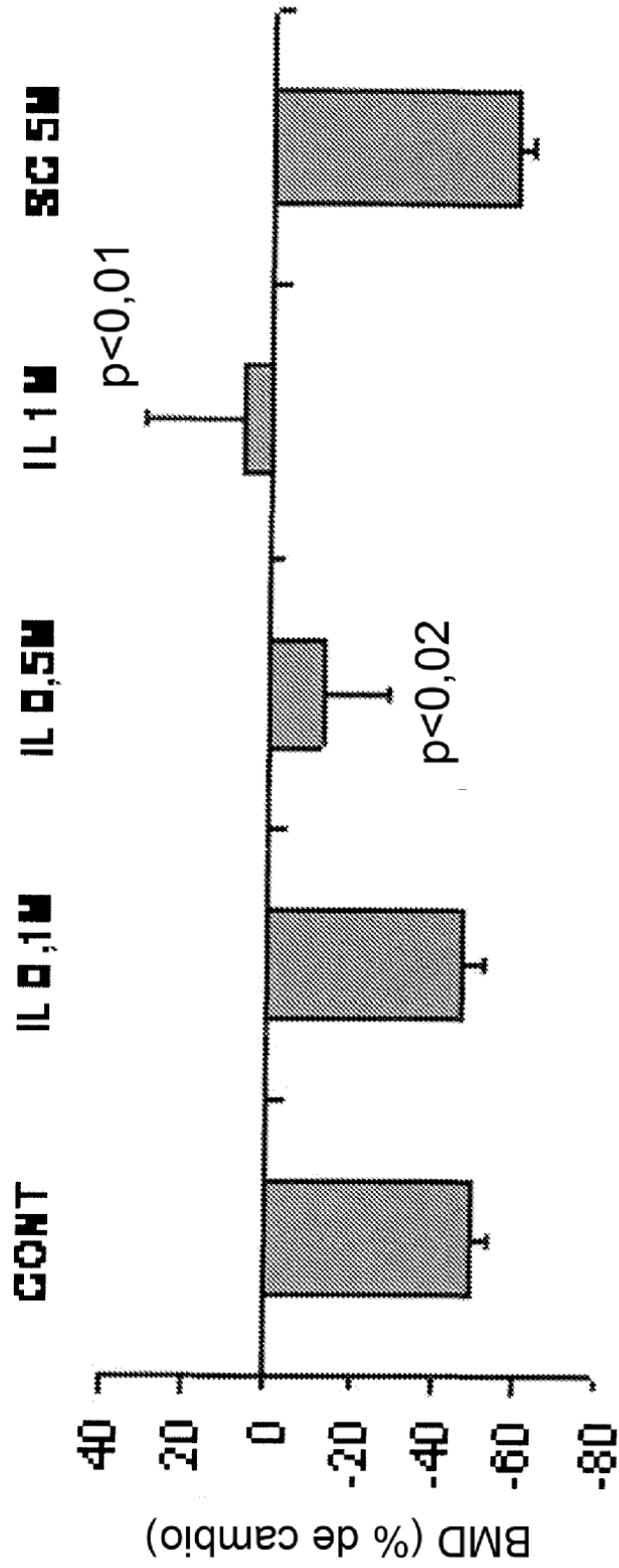


FIG. 9

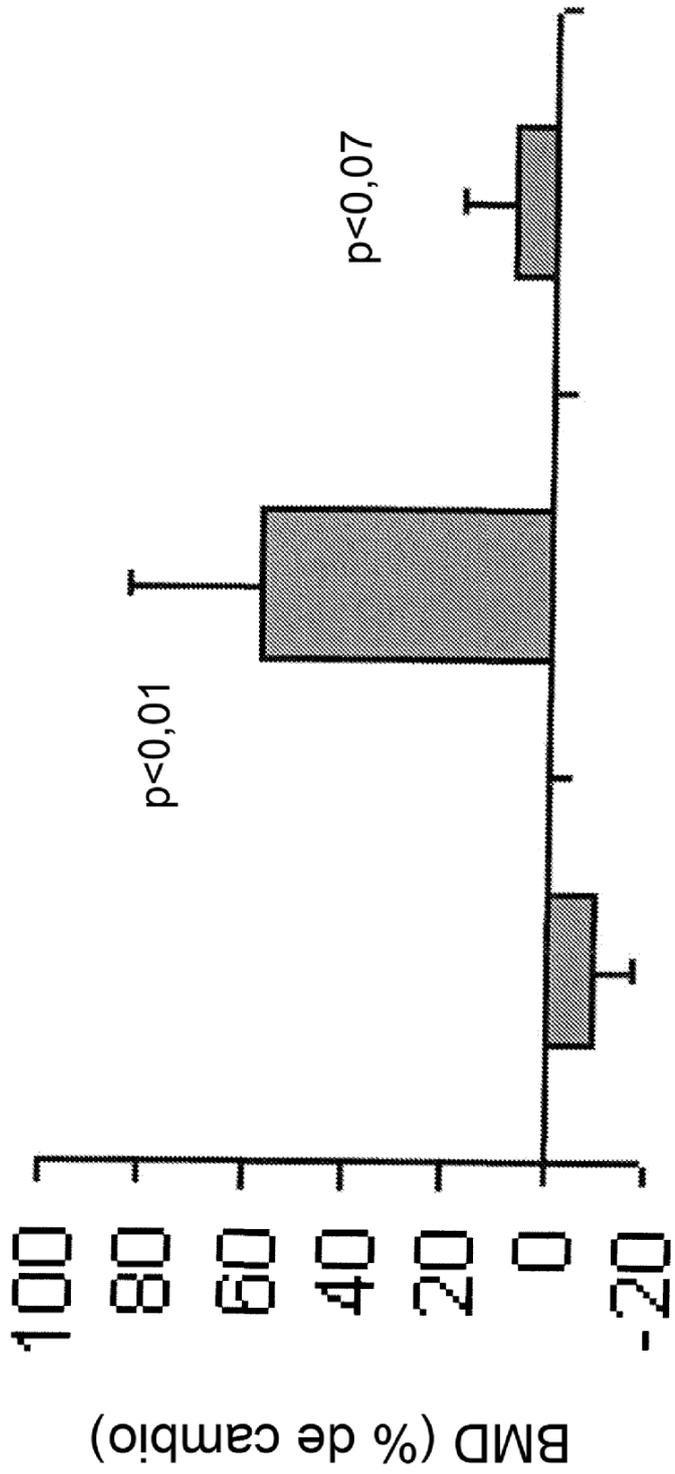


FIG. 10

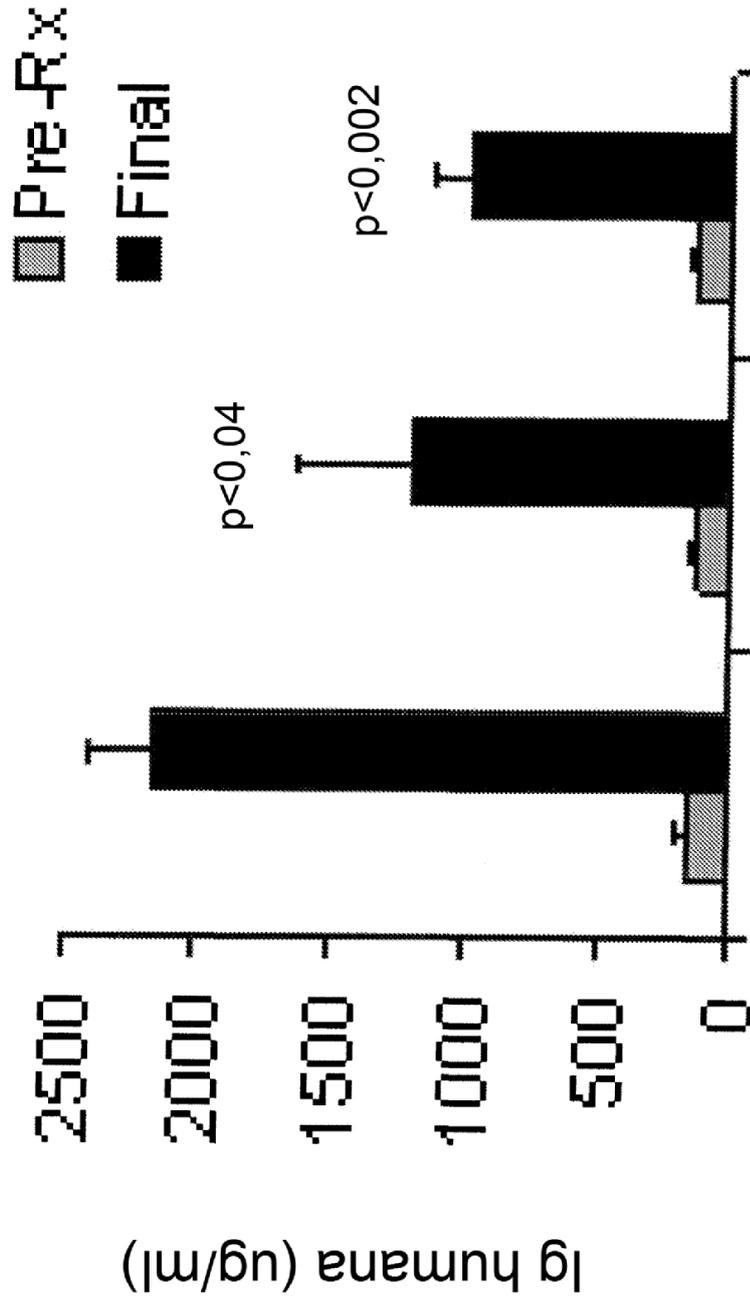


FIG. 11

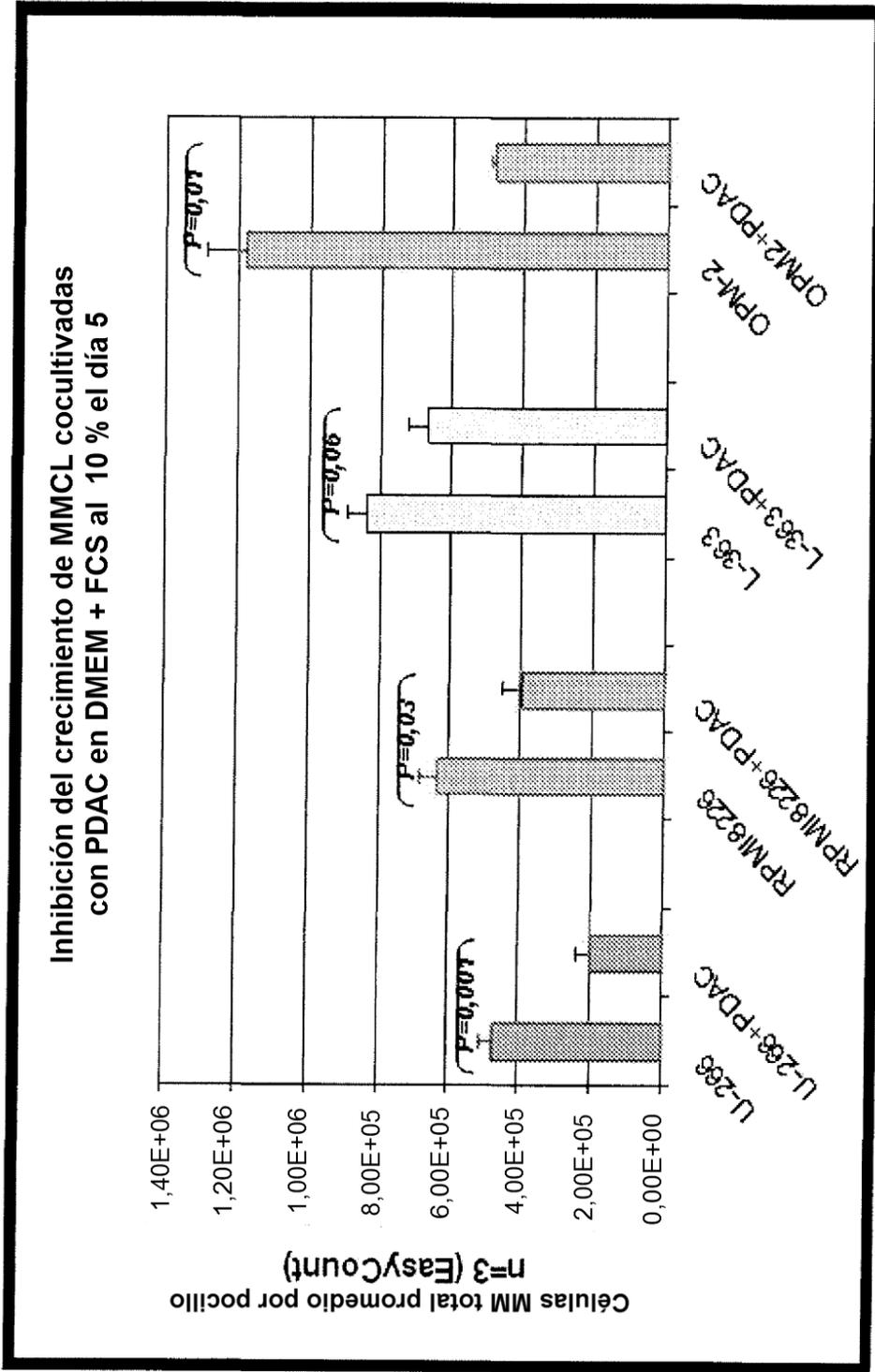


FIG. 12

Δ GM de H929+ PDA001 en comparación con H929 solo

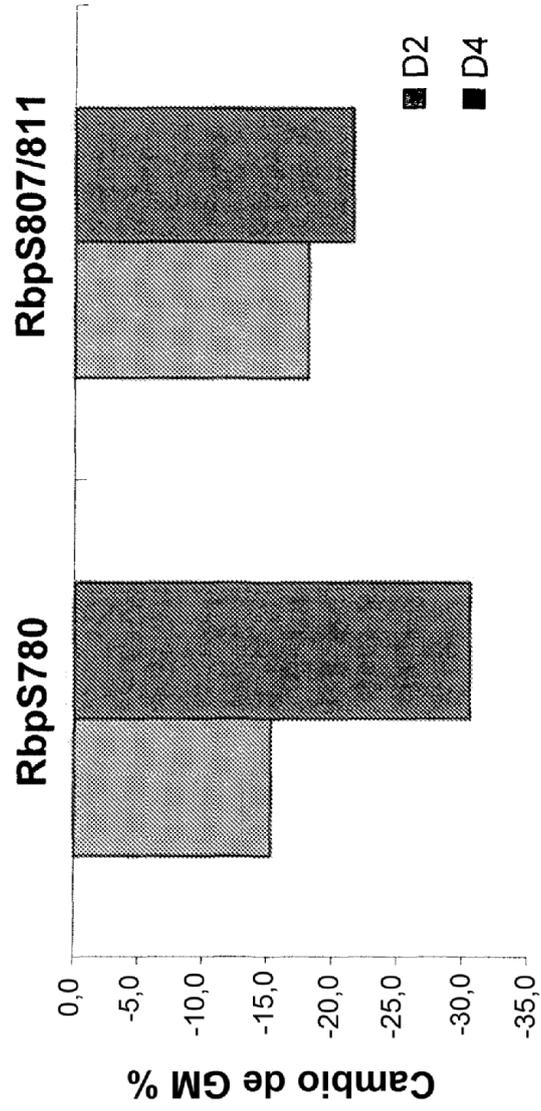


FIG. 13A

? GM de OPM2+PDA001 en comparación con OPM2 solo

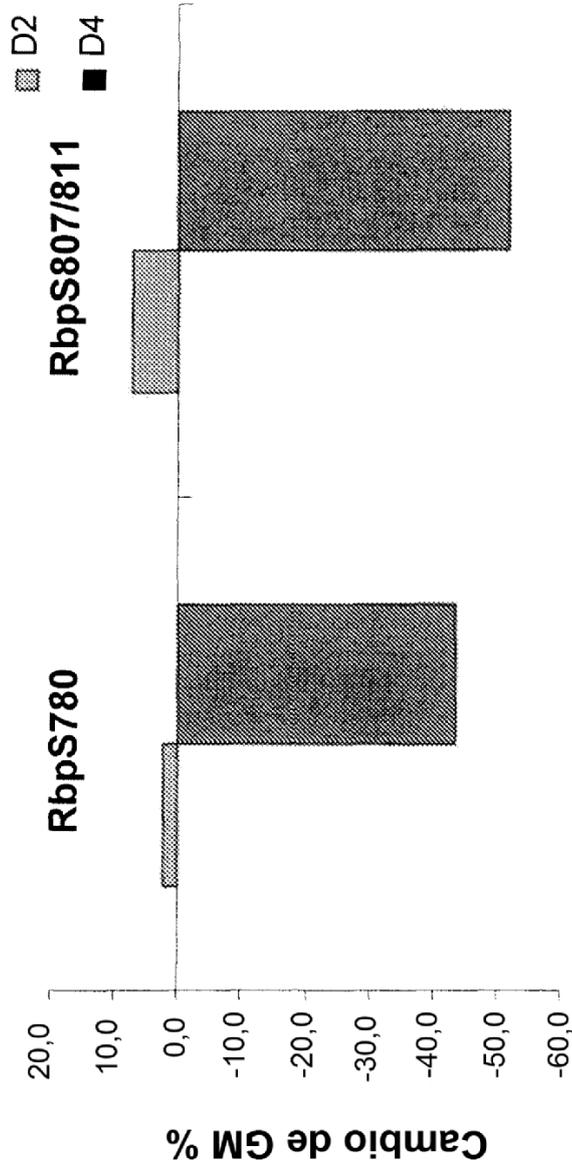


FIG. 13B

Comparación de GM con/sin PDA001 en LP1



FIG. 13C

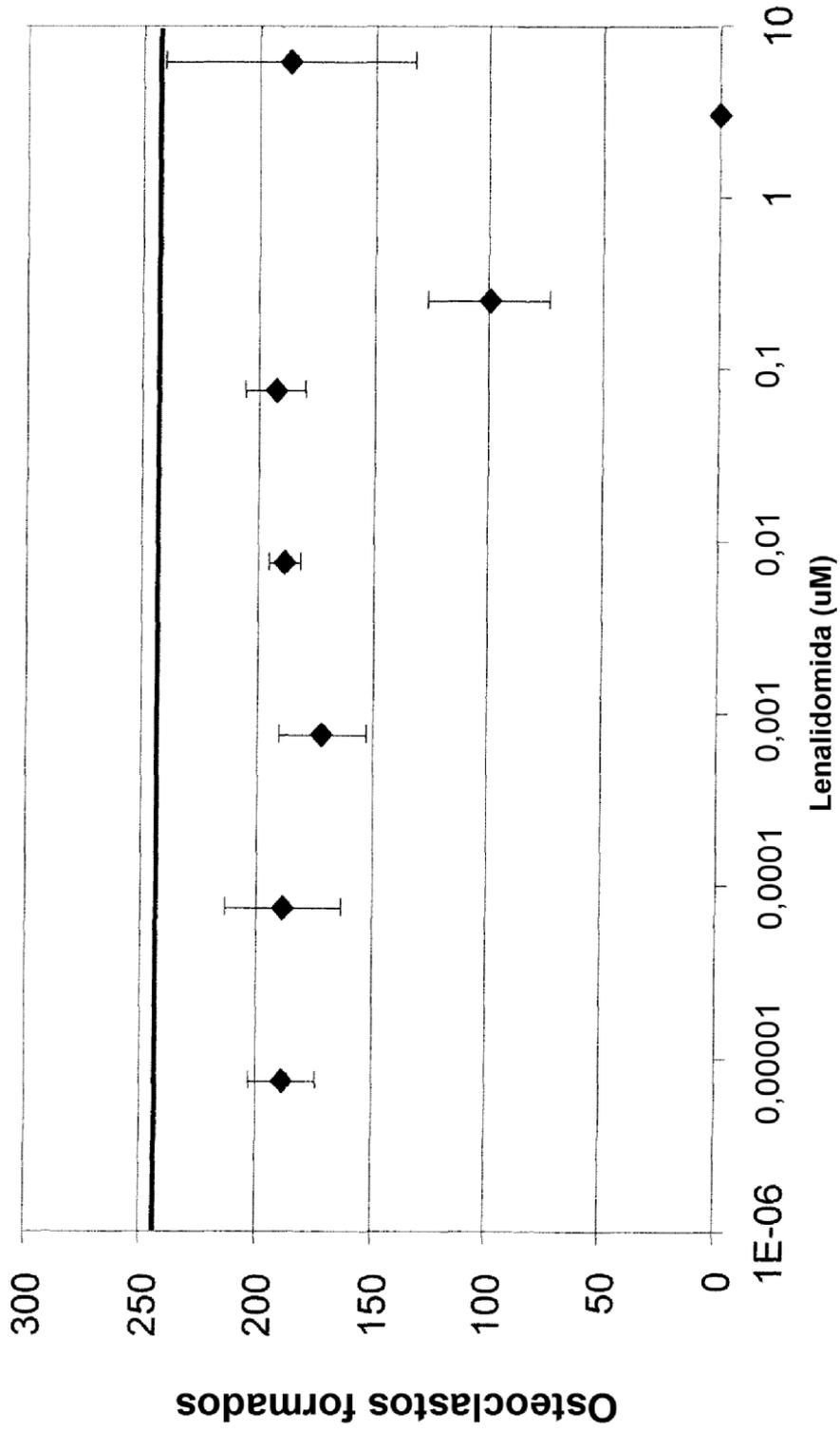


FIG. 14

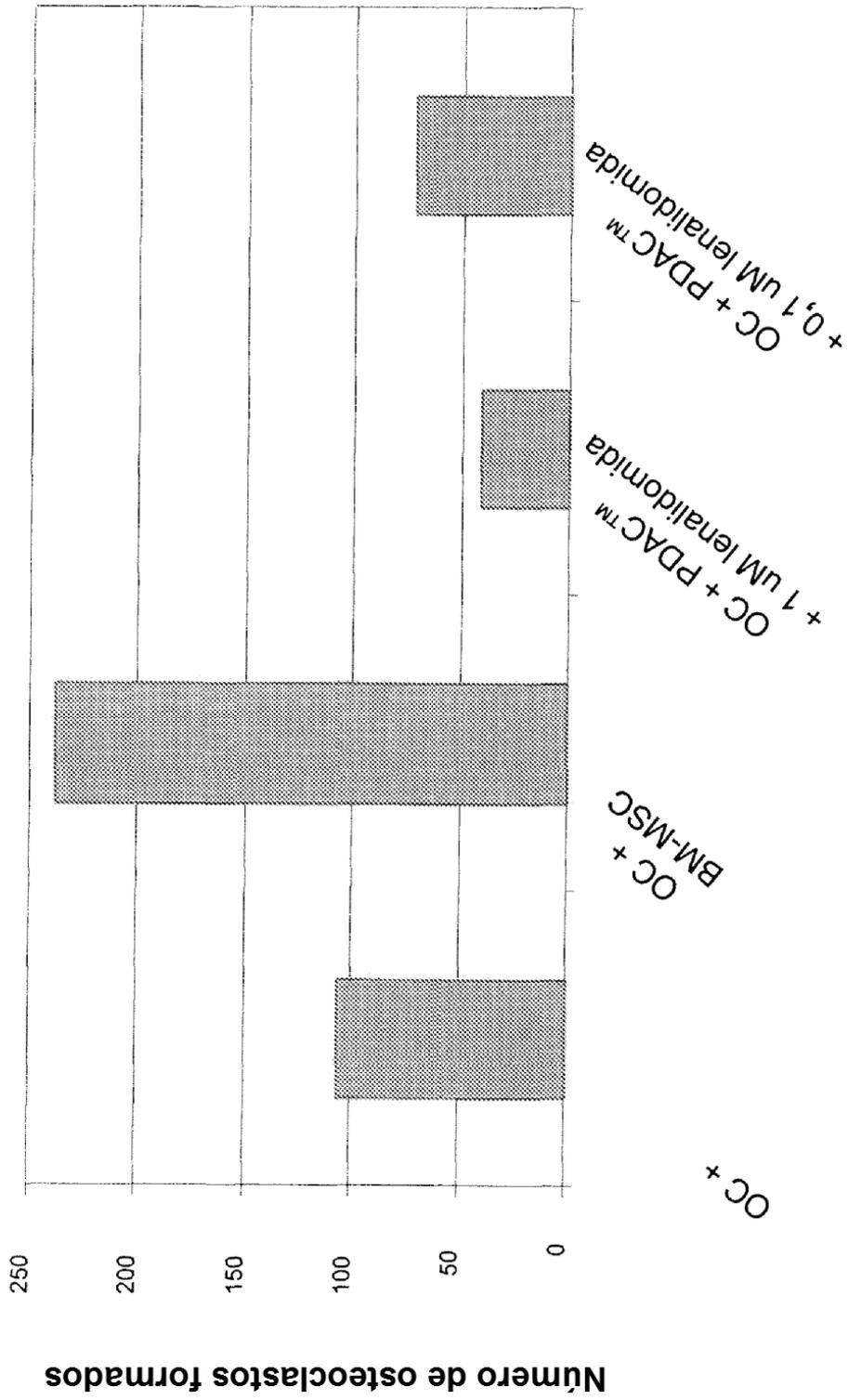


FIG. 15