

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 784**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/50** (2015.01)

**A61P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/025266**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159826**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14775592 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2968420**

54 Título: **Uso de células madre placentarias en el tratamiento de la lesión renal aguda**

30 Prioridad:

**14.03.2013 US 201361785252 P**

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

**12.03.2019**

73 Titular/es:

**CELULARITY, INC. (100.0%)  
33 Technology Drive  
Warren, NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**FISCHKOFF, STEVEN A. y  
CHEN, HONG-JUNG**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 703 784 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

Uso de células madre placentarias en el tratamiento de la lesión renal aguda

### 1. Introducción

5 En la presente memoria se proporcionan métodos de uso de células madre placentarias humanas en el tratamiento de sujetos que tienen una lesión renal aguda (LRA).

### 2. Antecedentes

10 La lesión renal aguda (LRA) es una afección caracterizada por la pérdida de la función renal provocada por diversas causas. En general, la LRA puede estar provocada por la exposición de los riñones a sustancias dañinas y/o la obstrucción del tracto urinario. Las causas específicas de LRA incluyen una enfermedad, lesión por aplastamiento, agentes de contraste, y antibióticos. La LRA se puede diagnosticar basándose en el análisis de los niveles, p.ej., de nitrógeno ureico en sangre y creatinina, o basándose en la incapacidad de los riñones de producir una cantidad suficiente de orina. No existen terapias específicas que sean capaces de atenuar la lesión renal aguda o acelerar la recuperación de la lesión renal aguda; en su lugar, los tratamientos existentes de la lesión renal aguda son de naturaleza sintomática. Véase Bellomo et al., 2012, Lancet 380:356-366. Así, en el campo médico existe la  
15 necesidad de composiciones y métodos mejorados para tratar la LRA.

### 3. Sumario

En un aspecto, en la presente memoria se proporcionan células madre placentarias para el uso en un método de tratamiento de la lesión renal aguda (LRA) en un sujeto que tiene LRA, en el que dicha LRA es el resultado de un traumatismo directo en uno o más de los riñones del sujeto.

20 En una realización, en la presente memoria se proporciona un método de tratamiento de LRA en un sujeto que tiene LRA, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para provocar una mejora detectable de uno o más síntomas de LRA, o una reducción de la progresión de uno o más síntomas de LRA, en el sujeto. En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona el uso de células madre placentarias en la fabricación de un medicamento para tratar la LRA.  
25

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método de prevención de un síntoma y/o una complicación asociados a LRA en un sujeto que tiene LRA. En una realización, en la presente memoria se proporciona un método de prevención de un síntoma y/o una complicación de LRA en un sujeto que tiene LRA, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, en el que la  
30 cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para prevenir el inicio de uno o más síntomas y/o complicaciones de LRA en el sujeto.

En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias administradas a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria es una cantidad suficiente para provocar una mejora detectable en, o una reducción en la progresión de, uno o más de los siguientes síntomas de  
35 LRA en el sujeto: fatiga, heces sanguinolentas, halitosis, sabor metálico en la boca, cardenales, temblor de manos, tensión arterial elevada, hemorragias nasales, hipo, convulsiones, disnea, cambios en el patrón de micciones (p.ej., pérdida de la capacidad de orinar con regularidad, o micción frecuente por la noche), pérdida del apetito, cefalea, náuseas y vómitos, latidos irregulares, dolor lumbar (p.ej., provocado por la trombosis de los vasos sanguíneos renales o la inflamación del riñón), sed, vejiga palpable, acumulación de líquido en las extremidades (edema periférico) y los pulmones (edema pulmonar), y/o taponamiento cardiaco.  
40

En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre placentarias administradas a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria es una cantidad suficiente para provocar uno o más de lo siguiente en el sujeto: un incremento de la tasa de filtración glomerular, una disminución del nivel de creatinina en suero, una disminución del nivel de creatinina en orina, un incremento del aclaramiento de  
45 creatinina, una disminución de los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN), una disminución de la excreción fraccional de sodio (el porcentaje de sodio filtrado por el riñón que se excreta en la orina), y/o una estabilización de la producción de orina (p.ej., un incremento de la producción de orina). En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre placentarias administradas a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria es una cantidad suficiente para provocar una disminución del daño renal en el sujeto asociado a LRA. Por ejemplo, los riñones del sujeto muestran menos hemorragia (sangrado), un número menor de infiltrados de células mononucleares, y/o menos necrosis (p.ej., necrosis del epitelio tubular).  
50

En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de LRA descritos en la presente memoria comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y una segunda terapia (p.ej., un segundo agente terapéutico) a un sujeto. El segundo agente terapéutico puede ser un agente usado en el  
55 tratamiento de LRA o un agente usado en el tratamiento de una enfermedad o afección que contribuye o que provoca la LRA en el sujeto. En ciertas realizaciones, la segunda terapia es un esteroide, un antibiótico, un diurético,

- 5 un agente inmunomodulador, o un agente inmunosupresor. En una realización específica, la segunda terapia es la diálisis. En otra realización específica, la segunda terapia es una terapia usada en el tratamiento de la hipertensión arterial, p.ej., un diurético, un beta-bloqueante, un inhibidor de ACE, un bloqueante de receptores de angiotensina II, un bloqueante de canales de calcio, un alfa-bloqueante, un antagonista de receptores alfa-2, un receptor adrenérgico periférico, o un vasodilatador.
- 10 En una realización específica, a un sujeto que tiene LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se le administran células madre placentarias en combinación con un agente anti-trombótico, p.ej., dextrano, heparina, dicumarol, aspirina, clopidogrel, dipiridamol, y abciximab. En otra realización específica, a un sujeto que tiene LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se le administran células madre placentarias en combinación con un agente antiinflamatorio, p.ej., DMSO, aspirina, ibuprofeno, naproxeno. En otra realización específica, a un sujeto que tiene LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se le administran células madre placentarias en combinación con un agente anti-trombótico y un agente anti-inflamatorio. De acuerdo con tales realizaciones, se pueden administrar las células madre placentarias a un sujeto antes, después, o simultáneamente con la administración del agente anti-trombótico y/o un agente anti-inflamatorio. En una realización específica, se administran las células madre placentarias a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria en una composición que comprende un agente anti-trombótico y un agente anti-inflamatorio. En otra realización específica, se administran las células madre placentarias a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria en una composición que comprende dextrano y DMSO.
- 15 20 La cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre placentarias administradas a un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se puede proporcionar mediante cualquier vía considerada adecuada, lo que incluye, sin limitación, la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intraventricular, intramuscular, transdérmica, o subcutánea. En una realización específica, las células madre placentarias se administran al sujeto de manera sistémica. En otra realización específica, las células madre placentarias se administran al sujeto de manera parenteral. En otra realización específica, las células madre placentarias se administran al sujeto de manera intravenosa. En otra realización específica, las células madre placentarias se administran al sujeto de manera subcutánea. En otra realización específica, la cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre placentarias se administra al sujeto directamente en el lugar de la lesión (p.ej., directamente en el área lesionada de un riñón), p.ej., las células madre placentarias se administran de manera local.
- 25 30 En una realización específica, las células madre placentarias usadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células madre placentarias usadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria expresan CD200 y no expresan HLA-G; o expresan CD73, CD105, y CD200; o expresan CD200 y OCT-4 (POU5F1<sup>+</sup>); o expresan CD73 y CD105 y no expresan HLA-G.
- 35 **3.1 Definiciones**
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "alrededor de", cuando se refiere a un valor numérico señalado, indica un valor dentro de más o menos el 10% del valor numérico señalado.
- 40 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", cuando se refiere a las células madre placentarias descritas en la presente memoria, significa un número particular de células placentarias, por ejemplo, un número de células madre placentarias que se administra en una o más dosis que es suficiente, p.ej., para provocar una mejora detectable, reducir la gravedad, o reducir la progresión, de uno o más síntomas y/o complicaciones de la LRA.
- 45 Tal como se usa en la presente memoria, el término "derivado" significa aislado o de otra manera purificado. Por ejemplo, las células adherentes derivadas de placenta se aíslan de la placenta. El término "derivado" abarca las células que se cultivan a partir de células aisladas directamente de un tejido, p.ej., la placenta, y las células cultivadas o expandidas a partir de aislamientos primarios.
- 50 Tal como se usa en la presente memoria, "inmunolocalización" significa la detección de un compuesto, p.ej., un marcador celular, mediante el uso de una proteína inmunitaria, p.ej., un anticuerpo o fragmento del mismo, por ejemplo, en citometría de flujo, clasificación celular activada por fluorescencia, clasificación celular magnética, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica, o similares.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "SH2" se refiere a un anticuerpo que se une a un epítipo del marcador CD105. Así, las células que se denominan SH2<sup>+</sup> son CD105<sup>+</sup>.
- Tal como se usan en la presente memoria, los términos "SH3" y SH4" se refieren a anticuerpos que se unen a epítopos presentes en el marcador CD73. Así, las células que se denominan SH3<sup>+</sup> y/o SH4<sup>+</sup> son CD73<sup>+</sup>.
- 55 Tal como se usa en la presente memoria, "OCT-4" es equivalente a POU5F1.
- Tal como se usa en la presente memoria, una célula madre está "aislada" si al menos un 50%, 60%, 70%, 80%,

90%, 95%, o al menos un 99% de las otras células con las que la célula madre está asociada de manera natural se separan de la célula madre, p.ej., durante la recogida y/o el cultivo de la célula madre. Una población de células "aisladas" significa una población de células que están separadas sustancialmente de las otras células del tejido, p.ej., la placenta, del que deriva la población de células. En ciertas realizaciones, una población, p.ej. de células madre, está "aislada" si al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o al menos un 99% de las células con las que la población de células madre están asociadas de manera natural se separan de la población de células madre, p.ej. durante la recogida y/o el cultivo de la población de células madre.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "célula madre placentaria" se refiere a una célula madre o célula progenitora que se obtiene, p.ej., se aísla, de una placenta de mamífero, independientemente de la morfología, los marcadores de la superficie celular, o el número de pases tras un cultivo primario, que se adhiere a un sustrato de cultivo de tejidos (p.ej., el plástico de cultivo de tejidos o una placa de cultivo de tejidos revestida de fibronectina). La expresión "célula madre placentaria", tal como se usa en la presente memoria, no se refiere, sin embargo, a un trofoblasto, un citotrofoblasto, célula germinal embrionaria, o célula madre embrionaria, tal como entienden esas células las personas de experiencia en la técnica. Una célula se considera una "célula madre" si la célula conserva al menos un atributo de una célula madre, p.ej. un marcador o perfil de expresión génica asociado a uno o más tipos de células madre; la capacidad de replicarse al menos 10-40 veces en cultivo; la multipotencia, p.ej., la capacidad de diferenciarse, *in vitro*, *in vivo* o ambos, hasta células de una o más de las tres capas germinales; la ausencia de características de las células adultas (es decir, diferenciadas), o similares. Las expresiones "célula madre placentaria" y "célula madre derivada de placenta" se pueden usar de manera intercambiable. A menos que se indique de otra manera en la presente memoria, el término "placentario" incluye el cordón umbilical. Las células madre placentarias descritas en la presente memoria, en ciertas realizaciones, son multipotentes *in vitro* (es decir, las células se diferencian *in vitro* en condiciones de diferenciación), multipotentes *in vivo* (es decir, las células se diferencian *in vivo*), o ambas.

Tal como se usa en la presente memoria, una célula madre es "positiva" para un marcador particular cuando ese marcador es detectable. Por ejemplo, una célula madre placentaria es positiva, p.ej., para CD73 porque CD73 es detectable en las células madre placentarias en una cantidad detectablemente mayor que el fondo (en comparación, p.ej. con un control de isotipo o un control negativo experimental para cualquier ensayo concreto). Una célula también es positiva para un marcador cuando se puede usar ese marcador para distinguir la célula de al menos otro tipo de célula, o se puede usar para seleccionar o aislar la célula cuando está presente o lo expresa la célula.

#### 30 4. Descripción Detallada

##### 4.1 Métodos de Tratamiento de la Lesión Renal Aguda

En la presente memoria se proporcionan métodos de tratamiento de la lesión renal aguda (LRA) en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de células madre placentarias. En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de LRA proporcionados en la presente memoria dan como resultado la mejora detectable de uno o más síntomas o complicaciones de LRA en el sujeto. En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de LRA proporcionados en la presente memoria dan como resultado la prevención del inicio de uno o más síntomas o complicaciones de LRA en el sujeto.

En una realización, en la presente memoria se proporciona un método de tratamiento de LRA en un sujeto que tiene LRA, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para provocar una mejora detectable de uno o más síntomas y/o complicaciones de LRA, o una reducción de la progresión de uno o más síntomas y/o complicaciones de LRA, en el sujeto.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método de prevención de un síntoma y/o una complicación de LRA en un sujeto que tiene LRA, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para prevenir el inicio de uno o más síntomas y/o complicaciones de LRA en el sujeto.

Los sujetos que tienen LRA tratados de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria pueden tener LRA debido a cualquier causa de LRA. En ciertas realizaciones, la LRA en un sujeto tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria está provocada por un traumatismo directo en uno o más de los riñones del sujeto, p.ej., el contacto de uno o más riñones de un sujeto que tiene LRA con algo que provoca un traumatismo en el riñón (p.ej., una contusión en el/los riñón(es)). En ciertas realizaciones, el/los síntoma(s) de LRA en un sujeto tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria está(n) provocado(s) por algo distinto de un traumatismo directo, p.ej., la LRA es el resultado de la existencia de otra afección o enfermedad en el sujeto (p.ej., la otra afección o enfermedad es la causa subyacente de la LRA). En ciertas realizaciones, los sujetos que tienen LRA tratados de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria tienen una LRA provocada por uno o más (p.ej., una combinación) de lo siguiente: necrosis tubular aguda (NTA), enfermedad renal autoinmunitaria, un coágulo sanguíneo de colesterol (émbolos de colesterol), flujo sanguíneo disminuido debido a tensión arterial baja (p.ej., provocada por una quemadura, deshidratación, hemorragia, lesión, choque séptico, enfermedad, o cirugía), un trastorno que provoca la coagulación dentro de los vasos sanguíneos del riñón, una infección que lesiona

directamente el riñón (p.ej., pielonefritis o septicemia aguda), complicaciones del embarazo (tales como desprendimiento de la placenta o placenta previa), y/o bloqueo del tracto urinario.

5 En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias administradas a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria es una cantidad suficiente para provocar una mejora detectable en, o una reducción en la progresión de, uno o más de los siguientes síntomas de LRA en el sujeto: fatiga, heces sanguinolentas, halitosis, sabor metálico en la boca, cardenales, temblor de manos, tensión arterial elevada, hemorragias nasales, hipo, convulsiones, disnea, cambios en el patrón de micciones (p.ej., pérdida de la capacidad de orinar con regularidad, o micción frecuente por la noche), pérdida del apetito, cefalea, náuseas y vómitos, latidos irregulares, dolor lumbar (p.ej., provocado por la trombosis de los vasos sanguíneos renales o la inflamación del riñón), sed, vejiga palpable, acumulación de líquido en las extremidades (edema periférico) y los pulmones (edema pulmonar), y/o taponamiento cardiaco.

10 En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre placentarias administradas a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria es una cantidad suficiente para prevenir el inicio, o la progresión, de uno o más de los siguientes síntomas de LRA en el sujeto: fatiga, heces sanguinolentas, halitosis, sabor metálico en la boca, cardenales, temblor de manos, tensión arterial elevada, hemorragias nasales, hipo, convulsiones, disnea, cambios en el patrón de micciones (p.ej., pérdida de la capacidad de orinar con regularidad, o micción frecuente por la noche), pérdida del apetito, cefalea, náuseas y vómitos, latidos irregulares, dolor lumbar (p.ej., provocado por la trombosis de los vasos sanguíneos renales o la inflamación del riñón), sed, vejiga palpable, acumulación de líquido en las extremidades (edema periférico) y los pulmones (edema pulmonar), y/o taponamiento cardiaco.

15 La determinación de la mejora, o una reducción en la progresión, de uno o más síntomas y/o complicaciones de LRA, puede incluir parámetros medibles objetivamente, tales como un incremento de la tasa de filtración glomerular, una disminución del nivel de creatinina en suero, una disminución del nivel de creatinina en orina, un incremento del aclaramiento de creatinina, una disminución de los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN), una disminución de la excreción fraccional de sodio (el porcentaje de sodio filtrado por el riñón que se excreta en la orina), y/o una estabilización de la producción de orina (p.ej., un incremento de la producción de orina); y parámetros medibles subjetivamente, tales como el bienestar del paciente, la percepción del paciente de la mejora de un síntoma de LRA, la percepción de reducción del dolor o molestia asociada a LRA, y similares.

20 La tasa de filtración glomerular (TFG) se refiere al caudal de líquido filtrado a través del riñón y, en ciertas realizaciones, se puede usar para estudiar la eficacia de los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria. Sin desear limitarse por la teoría, los sujetos que tienen LRA muestran una tasa de filtración glomerular disminuida, p.ej., en comparación con los sujetos que no tienen LRA. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar la tasa de filtración glomerular de un sujeto que tiene LRA. En una realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar la tasa de filtración glomerular de un sujeto que tiene LRA durante al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, o 12 meses. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar la tasa de filtración glomerular de un sujeto que tiene LRA durante el tratamiento, p.ej., mientras se administran al sujeto las células madre placentarias de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar la tasa de filtración glomerular de un sujeto que tiene LRA en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75%. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar la tasa de filtración glomerular de un sujeto que tiene LRA en un 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, o más del 75%. La tasa de filtración glomerular se puede determinar mediante cualquier método conocido para el técnico experto (véase, p.ej., Hjorth, 2002, *Pediatric Nephrology* 17:847-851).

25 La creatinina se filtra principalmente de la sangre en los riñones por medio de la filtración glomerular y la secreción tubular proximal. Los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y orina se elevarán si el filtrado del riñón es deficiente. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y/o la orina de un sujeto que tiene LRA. En una realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y/o la orina de un sujeto que tiene LRA durante al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, o 12 meses. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y/o la orina de un sujeto que tiene LRA durante el tratamiento, p.ej., mientras se administran al sujeto las células madre placentarias de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y/o la orina de un sujeto que tiene LRA en

al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75%. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y/o la orina de un sujeto que tiene LRA en un 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, o más del 75%.

Se pueden determinar los niveles de creatinina en la sangre mediante el uso de ensayos de aclaramiento de creatinina, que son muy conocidos en la técnica. En una realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar el aclaramiento de creatinina en un sujeto que tiene LRA durante al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, o 12 meses. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar el aclaramiento de creatinina en un sujeto que tiene LRA durante el tratamiento, p.ej., mientras se administran al sujeto las células madre placentarias de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar el aclaramiento de creatinina en un sujeto que tiene LRA en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75%. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar el aclaramiento de creatinina en un sujeto que tiene LRA en un 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, o más del 75%.

Los ensayos de nitrógeno ureico en sangre (BUN) miden la cantidad de nitrógeno ureico, un producto residual del metabolismo de las proteínas, en la sangre. En los sujetos sanos, la urea se elimina del torrente sanguíneo en los riñones. Así, se puede usar la medida de los niveles de nitrógeno ureico en sangre para estudiar la eficacia de los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria. En una realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir los niveles de BUN en un sujeto que tiene LRA durante al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, o 12 meses. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir los niveles de BUN en un sujeto que tiene LRA durante el tratamiento, p.ej., mientras se administran al sujeto las células madre placentarias de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir los niveles de BUN en un sujeto que tiene LRA en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75%. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir los niveles de BUN en un sujeto que tiene LRA en un 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, o más del 75%.

La excreción fraccional de sodio ( $\text{Na}^+$ ) representa el porcentaje de carga filtrada de  $\text{Na}^+$  que se excreta en la orina, y es una medida de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en el túbulo proximal del riñón. En una realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir la excreción fraccional de sodio en un sujeto que tiene LRA durante al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, o 12 meses. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir la excreción fraccional de sodio en un sujeto que tiene LRA durante el tratamiento, p.ej., mientras se administran al sujeto las células madre placentarias de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir la excreción fraccional de sodio en un sujeto que tiene LRA en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75%. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para disminuir la excreción fraccional de sodio en un sujeto que tiene LRA en un 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, o más del 75%.

Sin pretender limitarse por la teoría, la producción de orina se puede ver afectada en los sujetos que tienen LRA. En ciertas realizaciones, la administración de células madre placentarias a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria da como resultado la estabilización de la producción de orina del sujeto, p.ej., la producción de orina del sujeto se estabiliza en niveles normales para el sujeto o dentro del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75% de los niveles normales para el sujeto. En una realización, un sujeto que padece LRA tiene una producción de orina disminuida como resultado de la LRA. En una realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar la producción de orina en un sujeto que tiene LRA durante al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, o 12 meses. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar la producción de orina en un sujeto que tiene LRA durante el tratamiento, p.ej., mientras se administran al sujeto las células madre placentarias de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar la producción de orina en un sujeto que tiene LRA en al menos un 5%, 10%,

15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75%. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que es suficiente para incrementar la producción de orina en un sujeto que tiene LRA en un 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, o más del 75%.

5 En una realización específica, en la presente memoria se proporciona un método de tratamiento de LRA que comprende: (i) administrar células madre placentarias a un individuo que tiene LRA; (ii) determinar la tasa de filtración glomerular de dicho individuo tras la administración de las células madre placentarias; y (iii) si la tasa de filtración glomerular se incrementa alrededor del 5%, 10%, 15%, 20%, o 25%, o alrededor del 5-10%, 10-20%, 20-30%, en comparación con la tasa de filtración glomerular de dicho individuo antes de la administración de las células madre placentarias, repetir la administración de las células madre placentarias. En ciertas realizaciones, si la tasa de filtración glomerular no se incrementa tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la dosis de las células madre placentarias administradas. En ciertas realizaciones, si la tasa de filtración glomerular no se incrementa tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la frecuencia de administración de las células madre placentarias administradas.

15 En una realización específica, en la presente memoria se proporciona un método de tratamiento de LRA que comprende: (i) administrar células madre placentarias a un individuo que tiene LRA; (ii) determinar los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y/o la orina de dicho individuo tras la administración de las células madre placentarias; y (iii) si los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y/o la orina disminuyen alrededor del 5%, 10%, 15%, 20%, o 25%, o alrededor del 5-10%, 10-20%, 20-30%, en comparación con los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y/o la orina de dicho individuo antes de la administración de las células madre placentarias, repetir la administración de las células madre placentarias. En ciertas realizaciones, si los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y/o la orina no disminuyen tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la dosis de las células madre placentarias administradas. En ciertas realizaciones, si los niveles de creatinina en la sangre (p.ej., en el suero o plasma sanguíneo) y/o la orina no disminuyen tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la frecuencia de administración de las células madre placentarias administradas.

30 En una realización específica, en la presente memoria se proporciona un método de tratamiento de LRA que comprende: (i) administrar células madre placentarias a un individuo que tiene LRA; (ii) determinar el aclaramiento de creatinina de dicho individuo tras la administración de las células madre placentarias; y (iii) si el aclaramiento de creatinina se incrementa alrededor del 5%, 10%, 15%, 20%, o 25%, o alrededor del 5-10%, 10-20%, 20-30%, en comparación con el aclaramiento de creatinina de dicho individuo antes de la administración de las células madre placentarias, repetir la administración de las células madre placentarias. En ciertas realizaciones, si el aclaramiento de creatinina no se incrementa tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la dosis de las células madre placentarias administradas. En ciertas realizaciones, si el aclaramiento de creatinina no se incrementa tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la frecuencia de administración de las células madre placentarias administradas.

40 En una realización específica, en la presente memoria se proporciona un método de tratamiento de LRA que comprende: (i) administrar células madre placentarias a un individuo que tiene LRA; (ii) determinar los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) de dicho individuo tras la administración de las células madre placentarias; y (iii) si los niveles de BUN disminuyen alrededor del 5%, 10%, 15%, 20%, o 25%, o alrededor del 5-10%, 10-20%, 20-30%, en comparación con los niveles de BUN de dicho individuo antes de la administración de las células madre placentarias, repetir la administración de las células madre placentarias. En ciertas realizaciones, si los niveles de BUN no disminuyen tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la dosis de las células madre placentarias administradas. En ciertas realizaciones, si los niveles de BUN no disminuyen tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la frecuencia de administración de las células madre placentarias administradas.

50 En una realización específica, en la presente memoria se proporciona un método de tratamiento de LRA que comprende: (i) administrar células madre placentarias a un individuo que tiene LRA; (ii) determinar la excreción fraccional de sodio de dicho individuo tras la administración de las células madre placentarias; y (iii) si la excreción fraccional de sodio disminuye alrededor del 5%, 10%, 15%, 20%, o 25%, o alrededor del 5-10%, 10-20%, 20-30%, en comparación con la excreción fraccional de sodio de dicho individuo antes de la administración de las células madre placentarias, repetir la administración de las células madre placentarias. En ciertas realizaciones, si la excreción fraccional de sodio no disminuye tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la dosis de las células madre placentarias administradas. En ciertas realizaciones, si la excreción fraccional de sodio no disminuye tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la frecuencia de administración de las células madre placentarias administradas.

60 En una realización específica, en la presente memoria se proporciona un método de tratamiento de LRA que comprende: (i) administrar células madre placentarias a un individuo que tiene LRA; (ii) determinar la producción de orina de dicho individuo tras la administración de las células madre placentarias; y (iii) si la producción de orina se incrementa alrededor del 5%, 10%, 15%, 20%, o 25%, o alrededor del 5-10%, 10-20%, 20-30%, en comparación con

la producción de orina de dicho individuo antes de la administración de las células madre placentarias, repetir la administración de las células madre placentarias. En ciertas realizaciones, si la producción de orina no se incrementa tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la dosis de las células madre placentarias administradas. En ciertas realizaciones, si la producción de orina no se incrementa tras la administración de las células madre placentarias, se puede incrementar la frecuencia de administración de las células madre placentarias administradas.

En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre placentarias administradas a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria es una cantidad suficiente para provocar una disminución del daño renal en el sujeto asociado a LRA. Por ejemplo, los riñones del sujeto muestran menos hemorragia (sangrado), un número menor de infiltrados de células mononucleares, y/o menos necrosis (p.ej., necrosis del epitelio tubular).

En ciertas realizaciones, el sujeto que padece LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria tiene una edad de menos de 18 años. En una realización específica, el sujeto que padece LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria tiene una edad de menos de 13 años. En otra realización específica, el sujeto que padece LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria tiene una edad de menos de 12, menos de 11, menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6, o menos de 5 años. En otra realización específica, el sujeto que padece LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria tiene una edad de 1-3 años, 3-5 años, 5-7 años, 7-9 años, 9-11 años, 11-13 años, 13-15 años, 15-20 años, 20-25 años, 25-30 años, o más de 30 años. En otra realización específica, el sujeto que padece LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria tiene una edad de 30-35 años, 35-40 años, 40-45 años, 45-50 años, 50-55 años, 55-60 años, o más de 60 años. En otra realización específica, el sujeto que padece LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria tiene una edad de 60-65 años, 65-70 años, 70-75 años, 75-80 años, o más de 80 años.

En ciertas realizaciones, el sujeto que padece LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria tiene una enfermedad renal terminal. En ciertas realizaciones, el sujeto que padece LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se somete a diálisis.

En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento de LRA descritos en la presente memoria comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y una segunda terapia (p.ej., un segundo agente terapéutico) a un sujeto. El segundo agente terapéutico puede ser un agente usado en el tratamiento de LRA o un agente usado en el tratamiento de una enfermedad o afección que contribuye o que provoca la LRA en el sujeto. En ciertas realizaciones, la segunda terapia es un esteroide, un antibiótico, un diurético, un agente inmunomodulador, o un agente inmunosupresor. En una realización específica, la segunda terapia es la diálisis. En otra realización específica, la segunda terapia es una terapia usada en el tratamiento de la hipertensión arterial, p.ej., un diurético, un beta-bloqueante, un inhibidor de ACE, un bloqueante de receptores de angiotensina II, un bloqueante de canales de calcio, un alfa-bloqueante, un antagonista de receptores alfa-2, un receptor adrenérgico periférico, o un vasodilatador. De acuerdo con tales realizaciones, las células madre placentarias se pueden administrar a un sujeto antes, después, o simultáneamente con la administración de la segunda terapia. "Antes" o "después" significa que las células madre placentarias se administran con una separación de tiempo de más de alrededor de 15 minutos, tal como más de alrededor de cualquiera de 20, 30, 40, 50, 60, o más minutos respecto de la segunda terapia. "Simultáneamente" significa que la administración de las células madre placentarias coincide o se da dentro de alrededor de 15 minutos de la administración de la segunda terapia.

En una realización específica, a un sujeto que tiene LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se le administran células madre placentarias en combinación con un agente anti-trombótico, p.ej., dextrano, heparina, dicumarol, aspirina, clopidogrel, dipiridamol, y abciximab. En otra realización específica, a un sujeto que tiene LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se le administran células madre placentarias en combinación con un agente antiinflamatorio, p.ej., DMSO, aspirina, ibuprofeno, naproxeno. En otra realización específica, a un sujeto que tiene LRA tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se le administran células madre placentarias en combinación con un agente anti-trombótico y un agente anti-inflamatorio. De acuerdo con tales realizaciones, se pueden administrar las células madre placentarias a un sujeto antes, después, o simultáneamente con la administración del agente anti-trombótico y/o un agente anti-inflamatorio. En una realización específica, se administran las células madre placentarias a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria en una composición que comprende un agente anti-trombótico y un agente anti-inflamatorio. En otra realización específica, se administran las células madre placentarias a un sujeto que tiene LRA de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria en una composición que comprende dextrano y DMSO.

Un sujeto que tiene, o que experimenta, un síntoma o complicación asociado a LRA se puede tratar con células madre placentarias (y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos adicionales) en cualquier momento durante la progresión de la LRA, o en cualquier momento antes de que se presente un síntoma o complicación de LRA. Por ejemplo, un sujeto se puede tratar inmediatamente después de que se presente un síntoma o complicación de LRA, o en 1, 2, 3, 4, 5, 6 días desde la presentación de un síntoma o complicación de LRA, o en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más desde la presentación de un síntoma o



complicación de LRA, o en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años desde la presentación de un síntoma o complicación de LRA. El sujeto se puede tratar una vez, o múltiples veces durante el desarrollo clínico de la LRA. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria para tratar LRA, se puede tratar a un sujeto que tiene LRA con células madre placentarias, y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos, continuamente, para prevenir el inicio de un síntoma o complicación de LRA, p.ej., se pueden administrar células madre placentarias al sujeto según un régimen específico (p.ej., cada día, cada dos días, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, una vez al mes, cada tres meses, cada seis meses, o anualmente).

En una realización, se administra una dosis de alrededor de 300 millones de células madre placentarias a un sujeto que tiene LRA. La dosis, sin embargo, puede variar según las características físicas del sujeto, p.ej., el peso, y puede oscilar de 1 millón a 10.000 millones de células madre placentarias por dosis, entre 10 millones y 10.000 millones por dosis, o entre 100 millones y 500 millones de células madre placentarias por dosis. En una realización, una dosis de células madre placentarias usada de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria está contenida en una bolsa de sangre o bolsa similar, adecuada para una inyección rápida o administración mediante catéter. Las células madre placentarias usadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se pueden administrar en una única dosis, o en múltiples dosis. Cuando las células madre placentarias se administran en múltiples dosis de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, las dosis pueden ser parte de un régimen terapéutico diseñado para prevenir la existencia o progresión de uno o más síntomas o complicaciones de LRA, para reducir la gravedad de uno o más síntomas o complicaciones de LRA, o para tratar o mejorar uno o más síntomas o complicaciones de LRA. En otra realización, se administra una dosis de alrededor de, al menos, o como máximo,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  células madre placentarias a un sujeto que tiene LRA.

Las células madre placentarias útiles en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser cualquiera de las células madre placentarias descritas en la presente memoria (véase la Sección 4.2). En una realización específica, las células madre placentarias usadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria son células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> son además CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria expresan CD200 y no expresan HLA-G; expresan CD73, CD105, y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73 y CD105 y no expresan HLA-G; o cualquier combinación de lo anterior. En una realización específica, las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria son células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>. En otra realización específica, las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria son CD117.

En una realización, las células madre placentarias usadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria son de un banco de células, p.ej., un banco de células madre placentarias.

#### 4.2 Células Madre Placentarias y Poblaciones de Células Madre Placentarias

Las células madre placentarias para el uso en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser de origen fetal o materno (es decir, puede tener el genotipo de la madre o del feto). Las poblaciones de células madre placentarias, o las poblaciones de células que comprenden células madre placentarias, pueden comprender células madre placentarias que son de origen únicamente fetal o materno, o pueden comprender una población mixta de células madre placentarias de origen tanto fetal como materno. Las células madre placentarias, y las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias, se pueden identificar y seleccionar por las características morfológicas, de marcadores, y de cultivo discutidas más adelante.

Las células madre placentarias aisladas, p.ej., células madre placentarias multipotentes aisladas, y las poblaciones de tales células madre placentarias aisladas, útiles en los métodos descritos en la presente memoria, son células madre placentarias humanas adherentes a la superficie del cultivo de tejidos que tienen características de las células multipotentes o las células madre, y que expresan una diversidad de marcadores que se pueden usar para identificar y/o aislar las células, o las poblaciones de células que comprenden las células madre. Las células madre placentarias aisladas, y las poblaciones de células placentarias (p.ej., dos o más células madre placentarias aisladas) descritas en la presente memoria incluyen las células madre placentarias y las poblaciones de células que contienen células placentarias obtenidas directamente de la placenta, o cualquier parte de la misma (p.ej., corion, cotiledones placentarios, o similares). Las poblaciones de células placentarias aisladas también incluyen poblaciones de (es decir, dos o más) células madre placentarias aisladas en cultivo, y una población en un recipiente, p.ej., una bolsa. Las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria 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 placentarias, p.ej., las células multipotentes placentarias y las células madre placentarias, útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, se describen en la presente memoria y, p.ej., en las patentes de EE.UU. n°s 7.311.904; 7.311.905; y 7.468.276; y en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2007/0275362.

##### 4.2.1 Características Físicas y Morfológicas

En cultivo, las células madre placentarias para el uso en los métodos presentados en la presente memoria adoptan un aspecto general fibroblastoide, estrellado, con varias prolongaciones citoplasmáticas que se extienden desde el cuerpo celular central. Las células madre placentarias son, sin embargo, morfológicamente diferenciables de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que las células madre placentarias exhiben un mayor número de tales prolongaciones que los fibroblastos. Morfológicamente, las células madre placentarias también son distinguibles de las células madre hematopoyéticas, que adoptan en general una morfología más redondeada, o adoquinada, en cultivo.

#### 4.2.2 Marcadores de la Superficie Celular, Moleculares y Genéticos

En ciertas realizaciones, las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato del cultivo de tejidos, p.ej., la superficie del recipiente de cultivo de tejidos (p.ej., el plástico de cultivo de tejidos); y son CD10<sup>+</sup>, CD34, CD105<sup>+</sup>. En otra realización, las células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> usadas en los métodos descritos en la presente memoria son además CD200<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, las células madre placentarias usadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria tienen la capacidad de diferenciarse hasta células de un fenotipo neuronal, células de un fenotipo osteogénico, y/o células de un fenotipo condrogénico.

En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria, p.ej., células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, son además CD45<sup>-</sup> o CD90<sup>+</sup>, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria son además CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En ciertas realizaciones específicas, las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria son además OCT-4<sup>+</sup>, tal como se detecta mediante, p.ej., RT-PCR.

Las células madre placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria, p.ej., células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, no expresan en general alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA), p.ej., tal como se detecta mediante inmunolocalización. Las células madre placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria, p.ej., células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, en general expresan moléculas de la clase I del MHC, p.ej., HLA-A,B,C tal como se detectan mediante citometría de flujo.

En ciertas realizaciones, las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, y uno o más de CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, HLA-DR,DP,DQ<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-A,B,C<sup>+</sup>, PDL1<sup>+</sup>, y/o ABC-p<sup>+</sup> tal como se detectan mediante citometría de flujo. En otra realización, cualquiera de tales células también es Oct-4<sup>+</sup>, tal como se detecta mediante RT-PCR. En otras realizaciones, cualquiera de las células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> descritas anteriormente son además uno o más de CD29<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> o SH4<sup>+</sup>, tal como se detectan mediante citometría de flujo. En otra realización específica, las células madre placentarias son además uno o más de CD117<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, KDR (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, o el ligando de Muerte Programada-1 (PDL1<sup>+</sup>), o cualquier combinación de los mismos, tal como se detectan mediante citometría de flujo.

En otra realización, las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria, p.ej., células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, son además uno o más de CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD144/VE-cadherina<sup>low</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, o ligando de Muerte Programada-1 (PDL1<sup>+</sup>), o cualquier combinación de los mismos, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización, cualquiera de tales células también es Oct-4<sup>+</sup>, tal como se detecta mediante RT-PCR. En otra realización, las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria, p.ej., células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, son además CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD106/AVCAM<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD144NE-cadherina<sup>low</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, y ligando de Muerte Programada-1 (PDL1<sup>+</sup>), tal como se detectan mediante citometría de flujo.

En otra realización específica, cualquiera de las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria son además ABC-p<sup>+</sup>, tal como se detecta mediante citometría de flujo, u OCT-4<sup>+</sup> (POU5F1<sup>+</sup>), tal como se detecta mediante transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), en el que ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) o proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)), y OCT-4 es la proteína octámero-4 (POU5F1).

En otra realización específica, cualquiera de las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria son, además, uno o más de MHC-I<sup>+</sup> (p.ej., HLA-A,B,C<sup>+</sup>), MHC-II<sup>-</sup> (p.ej., HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>) o HLA-G<sup>-</sup>, tal como se detectan mediante citometría de flujo. En otra realización específica, cualquiera de las células madre placentarias descritas en la presente memoria son además MHC-I<sup>+</sup> (p.ej., HLA-A,B,C<sup>+</sup>), MHC-II<sup>-</sup> (p.ej., HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>) y HLA-G<sup>-</sup> tal como se detecta mediante citometría de flujo.

- En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria comprenden la administración de una composición que comprende una población de las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria. Las poblaciones ejemplares de células comprenden las células madre placentarias aisladas como se describe en la presente memoria, en las que las poblaciones de células comprenden, p.ej., al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de células madre placentarias aisladas; es decir, al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de células de dicha población son células madre placentarias aisladas.
- En una realización específica, al menos alrededor del 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células de las poblaciones de células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria no son de origen materno.
- En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas o las poblaciones de células madre placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria se aíslan de las células placentarias que no muestran las características de las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria, p.ej., las características enumeradas anteriormente.
- En otra realización específica de cualquiera de las realizaciones anteriores, la expresión de el/los marcador(es) celular(es) enumerado(s) (p.ej., el grupo de diferenciación o los marcador(es) inmunógeno(s)) se determina mediante citometría de flujo. En otra realización específica, la expresión de el/los marcador(es) se determina mediante RT-PCR.
- El perfil genético confirma que las células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, y las poblaciones de tales células madre placentarias aisladas, son distinguibles de otras células, p.ej., las células madre mesenquimatosas, p.ej., las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea. Las células madre placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria se pueden distinguir, p.ej., de las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea basándose en la expresión de uno o más genes, cuya expresión es significativamente mayor en las células madre placentarias aisladas en comparación con las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea. Por ejemplo, las células madre placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria se pueden distinguir de las 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 las que el o los genes son 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, NFE2 L3, 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, p.ej., la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2007/0275362. En ciertas realizaciones específicas, dicha expresión de dicho o dichos genes se determina, p.ej., mediante RT-PCR o análisis con micromatrices, p.ej., mediante el uso de una micromatriz U133-A (Affymetrix). En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas expresan dicho o dichos genes cuando se cultivan durante cierto número de duplicaciones de población, p.ej., de alrededor de 3 a alrededor de 35 duplicaciones de población, en un medio que comprende DMEM-LG (p.ej., de Gibco); 2% de suero de ternero fetal (p.ej., de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona 10<sup>-9</sup> M (p.ej., de Sigma); ácido ascórbico 2-fosfato 10<sup>-4</sup> M (p.ej., de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/mL (p.ej., 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 específica, el gen específico de la célula placentaria aislada es CD200.
- Las secuencias específicas representativas de estos genes se pueden hallar en GenBank con los n°s de acceso NM\_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), (NM\_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM\_001845 (COL4A1), NM\_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758 (DMD), AF293359 (DSC3), NM\_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM\_018215 (FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM\_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (IL1A), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2 L3), 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).
- En ciertas realizaciones específicas, dichas células madre placentarias aisladas expresan cada uno de ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2 L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, y ZC3H12A a un nivel detectablemente mayor que un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, cuando las células se cultivan en condiciones equivalentes.

En realizaciones específicas, las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria expresan CD200 y ARTS1 (regulador de aminopeptidasa del factor de necrosis tumoral tipo 1); ARTS-1 y LRAP (arginina aminopeptidasa derivada de leucocitos); IL6 (interleucina-6) y TGFB2 (factor de crecimiento transformante, beta 2); IL6 y KRT18 (queratina 18); IER3 (respuesta temprana inmediata 3), MEST (homólogo de transcrito específico de 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 detectablemente mayor que un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, en las que se ha sometido a dichas células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea a un número de pases de cultivo equivalente al número de pases al que se ha sometido a dichas células madre placentarias aisladas. En otras realizaciones específicas, las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria 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 detectablemente mayor que un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, en las que se ha sometido a dichas células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea a un número de pases de cultivo equivalente al número de pases al que se ha sometido a dichas células madre placentarias aisladas.

La expresión de los genes anteriormente mencionados se puede analizar mediante técnicas habituales. Por ejemplo, se pueden seleccionar individualmente sondas basadas en la secuencia de el/los gen(es) y construirlas mediante técnicas convencionales. La expresión de los genes se puede analizar, p.ej., sobre una micromatriz que comprende sondas hacia uno o más de los genes, p.ej., la matriz de Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133A 2.0 (Santa Clara, California). La expresión de estos genes se puede analizar incluso si la secuencia para un número de acceso particular de GenBank se modifica, ya que se pueden generar fácilmente sondas específicas hacia la secuencia modificada mediante el uso de técnicas habituales muy conocidas.

El nivel de expresión de estos genes se puede usar para confirmar la identidad de una población de células madre placentarias aisladas, para identificar que una población de células comprende al menos una diversidad de células madre placentarias aisladas, o similares. Las poblaciones de células madre placentarias aisladas, p.ej., cuya identidad se confirma, pueden ser clonales, p.ej., poblaciones de células madre placentarias aisladas expandidas a partir de una única célula madre placentaria aislada, o una población mixta de células madre placentarias, p.ej., una población de células que comprende células madre placentarias aisladas que se expanden a partir de múltiples células madre placentarias aisladas, o una población de células que comprende células madre placentarias aisladas, como se describe en la presente memoria, y al menos otro tipo de células.

El nivel de expresión de estos genes se puede usar para confirmar la identidad de una población de células madre placentarias aisladas, para identificar que una población de células comprende al menos una diversidad de células madre placentarias aisladas, o similares. Las poblaciones de células madre placentarias aisladas, p.ej., cuya identidad se confirma, pueden ser clonales, p.ej., poblaciones de células madre placentarias aisladas expandidas a partir de una única célula madre placentaria aislada, o una población mixta de células madre placentarias, p.ej., una población de células que comprende células madre placentarias aisladas que se expanden a partir de múltiples células madre placentarias aisladas, o una población de células que comprende células madre placentarias aisladas, como se describe en la presente memoria, y al menos otro tipo de células.

Se puede usar el nivel de expresión de los genes enumerados anteriormente para seleccionar poblaciones de células madre placentarias aisladas. Por ejemplo, se puede seleccionar una población de células, p.ej., células madre placentarias expandidas clonalmente, si la expresión de uno o más de los genes enumerados anteriormente es significativamente mayor en una muestra de la población de células que en una población equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea. Tal selección puede ser de una población de una diversidad de poblaciones de células madre placentarias aisladas, de una diversidad de poblaciones de células, cuya identidad no se conoce, etc.

Las células madre placentarias aisladas se pueden seleccionar basándose en el nivel de expresión de uno o más de tales genes en comparación con el nivel de expresión de dicho o dichos genes, p.ej., en un control de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea. En una realización, se usa el nivel de expresión de dicho o dichos genes en una muestra que comprende un número equivalente de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea como control. En otra realización, el control, para las células madre placentarias aisladas ensayadas en ciertas condiciones, es un valor numérico que representa el nivel de expresión de dicho o dichos genes en las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en dichas condiciones.

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

En ciertas realizaciones de cualquiera de las células madre placentarias descritas en la presente memoria, las células son humanas. En ciertas realizaciones de cualquiera de las células placentarias descritas en la presente memoria, las características de marcadores celulares o las características de expresión génica son marcadores humanos o genes humanos.

5 En otra realización específica de las células madre placentarias aisladas o las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria, dichas células o población se han expandido, por ejemplo, realizado pases al menos alrededor de, o como máximo, 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  
10 alrededor de, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 duplicaciones de población. En ciertas realizaciones, dichas células o poblaciones se han sometido a pases 3-10 veces, 3-8 veces, 3-6 veces, o 4, 5, 6, 7, o 8 veces. En ciertas realizaciones, dichas células o poblaciones han experimentado 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 duplicaciones de población. En otra  
15 realización específica de dichas células madre placentarias aisladas o poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas, dichas células o población son aislamientos primarios. En otra realización específica de las células madre placentarias aisladas, o las poblaciones de células que comprenden de manera predominante las células madre placentarias aisladas, que se describen en la presente memoria, dichas células madre placentarias aisladas son de origen fetal (es decir, tienen el genotipo fetal).

En ciertas realizaciones, dichas células madre placentarias aisladas no se diferencian durante el cultivo en un medio de cultivo, es decir, un medio formulado para estimular la proliferación, p.ej., durante la proliferación en el medio de  
20 cultivo. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas no requieren una capa de soporte para proliferar. En otra realización específica, dichas células madre placentarias aisladas no se diferencian en cultivo en ausencia de una capa de soporte, únicamente debido a la carencia de la capa de células de soporte.

En otra realización, las células placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria son positivas para la aldehído deshidrogenasa (ALDH), tal como se analiza mediante un ensayo de actividad de aldehído  
25 deshidrogenasa. Tales ensayos se conocen en la técnica (véase, p.ej., Bostian y Betts, *Biochem. J.*, 173, 787, (1978)). En una realización específica, dicho ensayo de ALDH usa ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregón) como marcador de la actividad de aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, entre alrededor del 3% y alrededor del 25% de las células madre placentarias son positivas para ALDH. En otra realización, dichas células madre placentarias aisladas muestran una actividad de ALDH al menos tres veces, o al menos cinco veces, mayor  
30 que una población de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea que tiene alrededor del mismo número de células y que se cultiva en las mismas condiciones.

En ciertas realizaciones de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria, las células madre placentarias de dichas poblaciones de células están sustancialmente exentas de células con un genotipo materno; p.ej., al menos un 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%,  
35 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células madre placentarias de dicha población tienen un genotipo fetal. En algunas otras realizaciones 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 están sustancialmente exentas de células con un genotipo materno; p.ej., al menos un 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células de dicha  
40 población tienen un genotipo fetal.

En una realización específica de cualquiera de las células madre placentarias aisladas anteriores o las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas, el cariotipo de las células, p.ej., de todas las células, o al menos alrededor del 95% o alrededor del 99% de las células de dicha población, es normal. En otra  
45 realización específica de cualquiera de las células madre placentarias anteriores o las poblaciones de células madre placentarias, las células madre placentarias no son de origen materno.

En una realización específica de cualquiera de las realizaciones de las células placentarias descritas en la presente memoria, las células placentarias son genéticamente estables, y muestran un recuento de cromosomas diploides normales y un cariotipo normal.

Las células madre placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria, o las poblaciones  
50 de células madre placentarias aisladas usadas en los métodos descritos en la presente memoria, que albergan cualquiera de las combinaciones anteriores de marcadores, se pueden combinar en cualquier proporción. Se pueden combinar dos o más de las células madre placentarias aisladas anteriores o poblaciones 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 definidas por una de las combinaciones  
55 de marcadores descritas anteriormente, y una segunda población de células madre placentarias aisladas definidas por otra de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente, en las que dicha primera y segunda poblaciones se combinan en una proporción de alrededor de 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 alrededor de 99:1. De manera similar, se pueden combinar dos, tres, cinco o más de las células madre placentarias aisladas descritas anteriormente o poblaciones de  
60 células madre placentarias aisladas.

Las células madre placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritas en la presente memoria se pueden obtener, p.ej., mediante la disociación del tejido placentario, con o sin digestión enzimática (véase la Sección 4.5.3) o perfusión (véase la Sección 4.5.4). Por ejemplo, se pueden producir poblaciones de células madre placentarias aisladas según un método que comprende perfundir una placenta de mamífero que se ha drenado de la sangre del cordón y perfundido para eliminar la sangre residual; perfundir dicha placenta con una disolución de perfusión; y recoger dicha disolución de perfusión, en el que dicha disolución de perfusión tras la perfusión comprende una población de células placentarias que comprende las células madre placentarias aisladas; y aislar dichas células madre placentarias a partir de dicha población de células. En una realización específica, la disolución de perfusión se hace pasar a través de la vena umbilical y de las arterias umbilicales, y se recoge tras exudar de la placenta. En otra realización específica, la disolución 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 a partir de la perfusión de una placenta, son al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos un 99,5% de dicha población de células madre placentarias. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas recogidas mediante perfusión comprenden células fetales y maternas. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas recogidas mediante perfusión son al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos un 99,5% de las células fetales.

En otra realización específica, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende una población de las células madre placentarias aisladas, como se describe en la presente memoria, recogidas (aisladas) mediante perfusión, en la que dicha composición comprende al menos una porción de la disolución de perfusión usada para aislar las células madre placentarias.

Las poblaciones de las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria se pueden producir digiriendo el tejido placentario con una enzima que disocia el tejido para obtener una población de células placentarias que comprenden las células madre placentarias, y aislando, o aislando sustancialmente, las células madre placentarias a partir de los restos de dichas células placentarias. Se puede digerir la totalidad o cualquier parte de la placenta para obtener las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria. En realizaciones específicas, por ejemplo, dicho tejido placentario puede ser una placenta completa (p.ej., que incluye un cordón umbilical), amnios, corion, una combinación de amnios y corion, o una combinación de cualquiera de lo anterior. En otras realizaciones específicas, la enzima que disocia el tejido es tripsina o colagenasa. En diversas realizaciones, las células madre placentarias aisladas, contenidas en una población de células obtenida a partir de la digestión de una placenta, son al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos un 99,5% de dicha población de células placentarias.

Las poblaciones de células madre placentarias aisladas descritas anteriormente, y las poblaciones de células madre placentarias aisladas en general, pueden comprender alrededor de, al menos, o como máximo,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más de las células madre placentarias aisladas. Las poblaciones de células madre placentarias aisladas útiles en los métodos descritos en la presente memoria comprenden al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de células madre placentarias aisladas viables, p.ej., tal como se determina mediante, p.ej., exclusión de azul tripán.

Para cualquiera de las células madre placentarias anteriores, o las poblaciones de células madre placentarias, las células o la población de células madre placentarias son, o pueden comprender, células que se han sometido a pases al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, o 20 veces, o más, o se han expandido durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 duplicaciones de población, o más. En ciertas realizaciones, las células o la población de células madre placentarias son, o pueden comprender, células que se han sometido a pases 3-10 veces, 3-8 veces, 3-6 veces, o 4, 5, 6, 7, o 8 veces. En ciertas realizaciones, las células o la población de células madre placentarias son, o pueden comprender, células que han experimentado 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 duplicaciones de población.

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

Las células madre placentarias aisladas, o las poblaciones de células madre placentarias aisladas, que albergan cualquiera de las combinaciones anteriores de marcadores, se pueden combinar en cualquier proporción. Dos o más de las poblaciones de células madre placentarias anteriores se pueden aislar, o enriquecer, para formar una población de células madre placentarias. Por ejemplo, una población de células madre placentarias aisladas que comprende una primera población de células madre placentarias definidas por una de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente se puede combinar con una segunda población de células madre placentarias definidas por otra de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente, en las que dicha primera y segunda poblaciones se combinan en una proporción de alrededor de 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 alrededor de 99:1. De manera similar, se pueden combinar tres, cuatro, cinco o más de las células madre placentarias descritas anteriormente o poblaciones de células madre placentarias.

5 En una realización específica de las células madre placentarias mencionadas anteriormente, las células madre placentarias secretan de manera constitutiva IL-6, IL-8 y proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1).

10 En ciertas realizaciones, las poblaciones de células placentarias descritas anteriormente pueden comprender alrededor de, al menos, o como máximo,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más células madre placentarias. En ciertas realizaciones, las poblaciones de células placentarias descritas anteriormente pueden comprender de alrededor de  $1 \times 10^5$  a alrededor de  $1 \times 10^6$ , alrededor de  $1 \times 10^5$  a alrededor de  $1 \times 10^7$ , alrededor de  $1 \times 10^6$  a alrededor de  $1 \times 10^7$ , alrededor de  $1 \times 10^6$  a alrededor de  $1 \times 10^8$ , alrededor de  $1 \times 10^7$  a alrededor de  $1 \times 10^8$ , alrededor de  $1 \times 10^7$  a alrededor de  $1 \times 10^9$ , alrededor de  $1 \times 10^8$  a alrededor de  $1 \times 10^{10}$ , alrededor de  $1 \times 10^9$  a alrededor de  $1 \times 10^{10}$ , o alrededor de  $1 \times 10^{10}$  a alrededor de  $1 \times 10^{11}$  células madre placentarias.

15 En ciertas realizaciones, las células madre placentarias útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria no expresan CD34, tal como se detecta mediante inmunolocalización, tras la exposición a 1 a 100 ng/mL de VEGF durante 4 a 21 días. En una realización específica, dichas células madre placentarias son adherentes al plástico del cultivo de tejidos. En otra realización específica, dichas células madre placentarias inducen que las células endoteliales formen brotes o estructuras tubulares, p.ej., cuando se cultivan en presencia de un factor angiogénico tal como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), p.ej., en un sustrato tal como MATRIGEL™.

20 En otro aspecto, las células madre placentarias útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria, o una población de células, p.ej., una población de células madre placentarias útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria, o una población de células en la que al menos alrededor del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las células de dicha población de células son células madre placentarias, secretan uno o más, o todos, de VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, o galectina-1, p.ej., en un medio de cultivo en el que se cultiva la célula, o células. En otra realización, las células madre placentarias expresan niveles incrementados de CD202b, IL-8 y/o VEGF en condiciones hipóxicas (p.ej., menos de alrededor del 5% de  $O_2$ ) en comparación con las condiciones normóxicas (p.ej., alrededor del 20% o 30 alrededor del 21% de  $O_2$ ).

35 En otra realización, cualquiera de las células madre placentarias o poblaciones de células que comprenden células madre placentarias útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria pueden provocar la formación de brotes o estructuras tubulares en una población de células endoteliales en contacto con dichas células madre placentarias. En una realización específica, las células madre placentarias se co-cultivan con células endoteliales humanas, que forman brotes o estructuras tubulares, o mantienen la formación de brotes en las células endoteliales, p.ej., cuando se cultivan en presencia de proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno tipo I y IV, y/o factores angiogénicos tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), p.ej., en o sobre un sustrato tal como colágeno placentario o MATRIGEL™ durante al menos 4 días. En otra 40 realización, cualquiera de las poblaciones de células que comprenden de manera predominante células madre placentarias, descritas en la presente memoria, secretan factores angiogénicos tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), o Interleucina-8 (IL-8), y de ese modo pueden inducir que las células endoteliales humanas formen brotes o estructuras tubulares cuando se cultivan en presencia de 45 proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno tipo I y IV p.ej., en o sobre un sustrato tal como colágeno placentario o MATRIGEL™.

50 En otras realizaciones, cualquiera de las poblaciones anteriores de células que comprenden células madre placentarias útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria secretan factores angiogénicos. En realizaciones específicas, la población de células secreta factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), y/o interleucina-8 (IL-8). En otras realizaciones específicas, las células madre placentarias o la población de células que comprende de manera predominante células madre placentarias secretan uno o más factores angiogénicos, y de ese modo inducen que las células endoteliales humanas migren en un ensayo de cicatrización de heridas *in vitro*. En otras realizaciones específicas, las células madre placentarias, o la 55 población de células que comprende de manera predominante células madre placentarias, inducen la maduración, diferenciación o proliferación de células endoteliales humanas, progenitores endoteliales, miocitos o mioblastos.

#### 4.2.3 Crecimiento en Cultivo

El crecimiento de las células placentarias útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria, como para cualquier célula de mamífero, depende en parte del medio particular seleccionado para el crecimiento. En

condiciones óptimas, tales células madre placentarias en general duplican su número en 3-5 días. Durante el cultivo, las células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria se adhieren a un sustrato en cultivo, p.ej., la superficie de un recipiente de cultivo de tejidos (p.ej., el plástico de una placa de cultivo de tejidos, plástico revestido de fibronectina, y similares) y forman una monocapa.

- 5 Las poblaciones de células placentarias aisladas que comprenden las células madre placentarias útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria, cuando se cultivan en condiciones adecuadas, pueden formar cuerpos de tipo embrioide, es decir, agrupamientos tridimensionales de células que crecen encima de la capa de células madre adherentes. Las células madre mesenquimatosas, p.ej., células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, no desarrollan cuerpos de tipo embrioide en cultivo.

#### 10 4.2.4 Diferenciación

- Las células placentarias útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria, en ciertas realizaciones, son diferenciables en diferentes linajes celulares asignados. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las células placentarias se pueden diferenciar hasta células de linaje adipogénico, condrogénico, neurogénico, u osteogénico. Tal diferenciación se puede llevar a cabo, p.ej., mediante cualquier método conocido en la técnica para diferenciar, p.ej., células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea hasta linajes celulares similares, o mediante los métodos descritos en otra parte en la presente memoria. Los métodos específicos de diferenciación de células placentarias hasta linajes celulares particulares se describen, p.ej., en las patentes de EE.UU. n°s 7.311.905 y 8.057.788.

- 20 Las células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria pueden exhibir la capacidad de diferenciarse en un linaje celular particular *in vitro*, *in vivo*, o *in vitro* e *in vivo*. En una realización específica, las células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria se pueden diferenciar *in vitro* cuando se colocan en condiciones que provocan o estimulan la diferenciación en un linaje celular particular, pero no se diferencian de manera detectable *in vivo*, p.ej., en un modelo de ratón NOD-SCID.

#### 4.3 Métodos de Obtención de Células Placentarias

##### 25 4.3.1 Composición de Recogida de Células Madre

Las células placentarias se pueden recoger y aislar según los métodos proporcionados en la presente memoria. En general, las células madre se obtienen a partir de una placenta de mamífero mediante el uso de una disolución fisiológicamente aceptable, p.ej., una composición de recogida de células madre. Se describe con detalle una composición de recogida de células madre en la publicación de solicitud de EE.UU. relacionada n° 2007/0190042.

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

- 35 La composición de recogida de células madre puede comprender uno o más componentes que tienden a conservar las células placentarias, es decir, impiden que las células placentarias mueran, o retrasan la muerte de las células placentarias, reducen el número de células placentarias de una población de células que mueren, o similares, desde el momento de la recogida hasta el momento del cultivo. Tales componentes pueden ser, p.ej., un inhibidor de la apoptosis (p.ej., un inhibidor de caspasa o inhibidor de JNK); un vasodilatador (p.ej., sulfato magnésico, un fármaco antihipertensivo, péptido natriurético auricular (ANP), adrenocorticotropina, hormona de liberación de corticotropina, nitroprusiato sódico, hidralazina, trifosfato de adenosina, adenosina, indometacina o sulfato magnésico, un inhibidor de fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de la necrosis (p.ej., 2-(1H-Indol-3-il)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina, o clonazepam); un inhibidor de TNF- $\alpha$ ; y/o un perfluorocarbono de transporte de oxígeno (p.ej., bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

- 45 La composición de recogida de células madre puede comprender una o más enzimas de degradación de tejidos, p.ej., una metaloproteasa, una serin proteasa, una proteasa neutra, una RNasa, o una DNasa, o similares. Tales enzimas incluyen, pero sin limitación, colagenasas (p.ej., colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASE, hialuronidasa, y similares.

- La composición de recogida de células madre puede comprender una cantidad bactericida o bacteriostática eficaz de un antibiótico. En ciertas realizaciones no limitantes, el antibiótico es un macrólido (p.ej., tobramicina), una cefalosporina (p.ej., cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxil), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (p.ej., penicilina V) o una quinolona (p.ej., ofloxacino, ciprofloxacino o norfloxacino), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En una realización particular, el antibiótico es activo contra bacterias Gram(+) y/o Gram(-), p.ej., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y similares.

- 55 La composición de recogida de células madre también puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (alrededor de 1 mM a alrededor de 50 mM); D-glucosa (alrededor de 20 mM a alrededor de 100 mM); iones magnesio (alrededor de 1 mM a alrededor de 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 natural, un polisacárido tal como dextrano o un polietilén glicol presente de alrededor de 25 g/l a alrededor de 100 g/l, o alrededor de 40 g/l a alrededor de 60 g/l); un antioxidante (p.ej., hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presente de alrededor de 25  $\mu$ M a alrededor de 100  $\mu$ M); un agente reductor (p.ej., N-acetilcisteína presente de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 5 mM); un agente que previene la entrada de calcio en las células (p.ej., verapamilo presente de alrededor de 2  $\mu$ M a alrededor de 25  $\mu$ M); nitroglicerina (p.ej., alrededor de 0,05 g/L a alrededor de 0,2 g/L); un anticoagulante, en una realización, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de la sangre residual (p.ej., heparina o hirudina presentes a una concentración de alrededor de 1000 unidades/l a alrededor de 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (p.ej., amilorida, etil isopropil amilorida, hexametilen amilorida, dimetil amilorida o isobutil amilorida presente de alrededor de 1,0  $\mu$ M a alrededor de 5  $\mu$ M).

#### 4.3.2 Recogida y Manipulación de la Placenta

En general, se recupera una placenta humana poco después de su expulsión tras el parto. En una realización preferida, la placenta se recupera de una paciente después de obtener el consentimiento informado y el historial médico completo de la paciente, y se asocia a la placenta. Preferiblemente, el historial médico continúa después del parto. Tal historial médico se puede usar para coordinar el uso posterior de la placenta o de las células madre recogidas de la misma. Por ejemplo, las células placentarias humanas se pueden usar, en vista del historial médico, para la medicina personalizada del recién nacido asociado a la placenta, o para los progenitores, hermanos u otros familiares del recién nacido.

Antes de la recuperación de las células placentarias, se elimina la sangre de cordón umbilical y la sangre placentaria. En ciertas realizaciones, después del parto, se recupera la sangre de cordón de la placenta. La placenta se puede someter a un proceso convencional de recuperación de la sangre de cordón. En general, se usa una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para desangrar la placenta (véase, p.ej., Anderson, patente de EE.UU. nº 5.372.581; Hessel *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.415.665). La aguja o cánula se coloca normalmente en la vena umbilical y la placenta se puede masajear suavemente para facilitar el drenaje de la sangre de cordón de la placenta. Tal recuperación de la sangre de cordón se puede llevar a cabo comercialmente, p.ej., LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry y Cryocell. Preferiblemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional para minimizar la ruptura del tejido durante la recuperación de la sangre de cordón.

En general, se transporta una placenta desde la sala de partos o paritorio a otro lugar, p.ej., un laboratorio, para la recuperación de la sangre de cordón y la recogida de las células madre, p.ej., mediante perfusión o disociación del tejido. La placenta se transporta preferiblemente en un dispositivo de transporte estéril, aislado térmicamente (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28 °C), por ejemplo, colocando la placenta, con el cordón umbilical proximal pinzado, en una bolsa de plástico estéril con cierre de cremallera, que se coloca después en un recipiente aislado. En otra realización, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre de cordón sustancialmente como se describe en la solicitud de patente pendiente de Estados Unidos nº 11/230.760, presentada el 19 de septiembre de 2005. Preferiblemente, la placenta se transporta al laboratorio de cuatro a veinticuatro horas tras el parto. En ciertas realizaciones, se pinza el cordón umbilical proximal, preferiblemente a 4-5 cm (centímetros) desde la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de la sangre de cordón. En otras realizaciones, se pinza el cordón umbilical proximal tras la recuperación de la sangre de cordón, pero antes del procesamiento adicional de la placenta.

La placenta, antes de la recogida de las células madre, se puede almacenar en condiciones estériles y a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25 °C (grados centígrados). La placenta se puede almacenar durante un periodo de más de cuarenta y ocho horas, y preferiblemente durante un periodo de cuatro a veinticuatro horas antes de perfundir la placenta para eliminar la sangre de cordón residual. La placenta se almacena preferiblemente en una disolución anticoagulante a una temperatura de 5 a 25 °C (grados centígrados). Se conocen bien en la técnica las disoluciones anticoagulantes adecuadas. Por ejemplo, se puede usar una disolución de heparina o warfarina sódica. En una realización preferida, la disolución anticoagulante comprende una disolución de heparina (p.ej., 1% p/p en una disolución 1:1000). La placenta desangrada se almacena preferiblemente durante como máximo 36 horas antes de recoger las células placentarias.

La placenta de mamífero o una parte de la misma, una vez recogida y preparada en general como antes, se puede tratar de cualquier manera conocida en la técnica, p.ej., se puede perfundir o disociar, p.ej., digerir con una o más enzimas de disociación de tejidos, para obtener las células madre.

#### 4.3.3 Disociación Física y Digestión Enzimática del Tejido Placentario

En una realización, se recogen las células madre de una placenta de mamífero mediante disociación física, p.ej., digestión enzimática, del órgano, p.ej., mediante el uso de la composición de recogida de células madre descrita en la Sección 4.5.2 anterior. Por ejemplo, la placenta, o una porción de la misma, se puede, p.ej., triturar, cortar, trocear, cortar en dados, picar, macerar o similares, mientras está en contacto, p.ej., con un tampón, medio o una composición de recogida de células madre, y el tejido posteriormente se digiere con una o más enzimas. La placenta, o una porción de la misma, también se puede disociar físicamente y digerirla con una o más enzimas, y el

material resultante se sumerge después, o se mezcla, en un tampón, medio o una composición de recogida de células madre. Se puede usar cualquier método de disociación física, con tal de que el método de disociación proporcione una diversidad, más preferiblemente una mayoría, y más preferiblemente al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% de células viables de dicho órgano, tal como se determina, p.ej., mediante exclusión con azul tripán.

La placenta se puede diseccionar en componentes antes de la disociación física y/o la digestión enzimática y la recuperación de las células madre. Por ejemplo, las células placentarias se pueden obtener de la membrana amniótica, corion, cotiledones placentarios, o cualquier combinación de los mismos, o cordón umbilical, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, las células placentarias se obtienen del tejido placentario que comprende el amnios y corion, o amnios-corion y cordón umbilical. En una realización, las células madre se obtienen del amnios-corion y cordón umbilical en una proporción en peso de alrededor de 1:1. En general, las células placentarias se pueden obtener mediante la disociación de un bloque pequeño de tejido placentario, p.ej., un bloque de tejido placentario que tiene un volumen de alrededor de 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 alrededor de 1000 milímetros cúbicos.

Una composición preferida de recogida de células madre comprende una o más enzima(s) de disociación de tejidos, p.ej., tripsina, colagenasa, dispasa, papaína, quimotripsina, y/o elastasa. Las serinproteasas se pueden inhibir mediante alfa 2 microglobulina del suero, y por lo tanto el medio usado para la digestión normalmente carece de suero. Habitualmente se usan EDTA y DNasa en los procedimientos de digestión enzimática para incrementar la eficacia de la recuperación de células. El producto de la digestión se diluye preferiblemente para evitar atrapar las células madre dentro del producto de digestión viscoso.

Se puede usar cualquier combinación de enzimas de digestión de tejidos. Las proteasas se pueden usar en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o se pueden usar de manera secuencial para liberar las células placentarias. Por ejemplo, en una realización, una placenta, o una parte de la misma, se digiere primero con una cantidad adecuada de colagenasa I a 2 mg/ml durante 30 minutos, seguido de digestión con tripsina, 0,25%, durante 10 minutos, a 37 °C. Las serinproteasas preferiblemente se usan consecutivamente tras el uso de otras enzimas.

En otra realización, el tejido se puede disociar adicionalmente mediante la adición de un agente quelante, p.ej., ácido etilén glicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiamintetraacético (EDTA) a la composición de recogida de células madre que comprende las células madre, o a una disolución en la que el tejido se disocia y/o se digiere antes del aislamiento de las células madre con la composición de recogida de células madre.

Se apreciará que cuando se usa una placenta completa, o una porción de una placenta que comprende tanto células fetales como maternas (por ejemplo, cuando la porción de la placenta comprende el corion o los cotiledones), las células placentarias recogidas comprenderán una mezcla de células placentarias derivadas de fuentes tanto fetales como maternas. Cuando se usa una porción de la placenta que no comprende células maternas o que comprende un número insignificante de ellas (por ejemplo, amnios), las células placentarias recogidas comprenderán casi exclusivamente células placentarias fetales.

#### 4.3.4 Perfusión de la Placenta

Las células placentarias, p.ej., células madre placentarias, también se pueden obtener mediante la perfusión de la placenta de mamífero. Se describen métodos de perfusión de la placenta de mamífero para obtener células madre, p.ej., en Hariri, publicación de solicitud de EE.UU. nº 2002/0123141, y en la solicitud provisional de EE.UU. relacionada nº 60/754.969, titulada "Composición Mejorada para Recoger y Conservar Células Placentarias y Métodos de Uso de la Composición", presentada el 29 de diciembre de 2005.

Las células placentarias se pueden recoger mediante perfusión, p.ej., a través de la vasculatura placentaria, mediante el uso, p.ej., de una composición de recogida de células madre como disolución de perfusión. En una realización, se perfunde una placenta de mamífero mediante el paso de la disolución de perfusión a través de una o ambas de la arteria umbilical y la vena umbilical. El flujo de la disolución de perfusión a través de la placenta se puede conseguir mediante el uso, p.ej., del flujo por gravedad en la placenta. Preferiblemente, la disolución de perfusión se hace pasar a través de la placenta mediante el uso de una bomba, p.ej., una bomba peristáltica. La vena umbilical, p.ej., se puede canular con una cánula, p.ej., una cánula de TEFLON® o una cánula de plástico, que está conectada a un dispositivo de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El dispositivo de conexión estéril está conectado a un distribuidor de perfusión.

En la preparación para la perfusión, la placenta se orienta preferiblemente (p.ej., se suspende) de tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical están localizadas en el punto más alto de la placenta. La placenta se puede perfundir mediante el paso de un líquido de perfusión, p.ej., la composición de recogida de células madre proporcionada en la presente memoria, a través de la vasculatura placentaria, o a través de la vasculatura placentaria y el tejido circundante. En una realización, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente a una pipeta que está conectada por medio de un conector flexible a un depósito de la disolución

de perfusión. La disolución de perfusión se hace pasar a la vena y arteria umbilical. La disolución de perfusión exuda y/o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos de los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un recipiente abierto adecuado desde la superficie de la placenta que estaba unida al útero de la madre durante la gestación. La disolución de perfusión también se puede introducir a través de la abertura del cordón umbilical y dejar que fluya o percole de las aberturas de la pared de la placenta que contactaba con la pared uterina materna. En otra realización, la disolución de perfusión se hace pasar a través de las venas umbilicales y se recoge de la arteria umbilical, o se hace pasar a través de la arteria umbilical y se recoge de las venas umbilicales.

En una realización, el cordón umbilical proximal está pinzado durante la perfusión, y más preferiblemente, está pinzado a 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 desangramiento en general está coloreada con los eritrocitos residuales de la sangre de cordón y/o la sangre placentaria. El fluido de perfusión se hace más incoloro a medida que transcurre la perfusión, y las células residuales de la sangre de cordón se eliminan mediante el lavado de la placenta. En general, son adecuados de 30 a 100 ml (mililitros) de líquido de perfusión para desangrar inicialmente la placenta, pero se puede usar más o menos líquido de perfusión dependiendo de los resultados observados.

El volumen de líquido de perfusión usado para recoger las células placentarias puede variar dependiendo del número de células madre a recoger, del tamaño de la placenta, del número de recogidas a realizar con una única placenta, etc. En diversas realizaciones, el volumen del líquido de perfusión puede ser de 50 mL a 5000 mL, 50 mL a 4000 mL, 50 mL a 3000 mL, 100 mL a 2000 mL, 250 mL a 2000 mL, 500 mL a 2000 mL, o 750 mL a 2000 mL. En general, la placenta se perfunde con 700-800 mL de líquido de perfusión tras el desangramiento.

La placenta se puede perfundir una diversidad de veces a lo largo del transcurso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se debe perfundir una diversidad de veces, se puede mantener o cultivar en condiciones asépticas en un recipiente u otro envase adecuado, y perfundirla con la composición de recogida de células madre, o una disolución de perfusión habitual (p.ej., una solución salina normal tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (p.ej., heparina, warfarina sódica, cumarina, bishidroxycumarina), y/o con o sin un agente antimicrobiano (p.ej.,  $\beta$ -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomycin (p.ej., a 40-100  $\mu$ g/ml), penicilina (p.ej., a 40 U/ml), anfotericina B (p.ej., a 0,5  $\mu$ g/ml). En una realización, una placenta aislada se mantiene o se cultiva durante un periodo de tiempo sin recoger el perfundido, de forma que la placenta se mantiene o se cultiva durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 horas, o 2 o 3 o más días antes de la perfusión y recogida del perfundido. La placenta perfundida se puede mantener durante uno o más periodo(s) de tiempo adicional(es), p.ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más horas, y perfundirla una segunda vez, p.ej., 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 disolución de perfusión, p.ej., la composición de recogida de células madre, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos en los diferentes momentos se pueden procesar adicionalmente para recuperar poblaciones de células dependientes del tiempo, p.ej., células madre. También se pueden mezclar los perfundidos de diferentes momentos.

Sin desear limitarse por cualquier teoría, tras el desangramiento y después de un tiempo suficiente de perfusión de la placenta, se cree que las células placentarias migran a la microcirculación desangrada y perfundida de la placenta donde se recogen, preferiblemente mediante lavado en un recipiente de recogida mediante perfusión. La perfusión de la placenta aislada no solamente sirve para eliminar la sangre de cordón residual, sino que también proporciona a la placenta los nutrientes adecuados, que incluyen oxígeno. La placenta se puede cultivar y perfundir con una disolución similar a la que se usó para eliminar las células residuales de sangre de cordón, preferiblemente, sin la adición de agentes anticoagulantes.

La perfusión tal como se describe en la presente memoria da como resultado la recogida de significativamente más células placentarias que el número obtenible a partir de una placenta de mamífero no perfundida con dicha disolución, y no tratada de otra manera para obtener las células madre (p.ej., mediante disociación del tejido, p.ej., digestión enzimática). En este contexto, "significativamente más" significa al menos un 10% más. La perfusión proporciona significativamente más células placentarias que, p.ej., el número de células placentarias obtenibles a partir de un medio de cultivo en el que se ha cultivado una placenta, o porción de la misma.

Las células madre se pueden aislar a partir de placenta mediante perfusión con una disolución que comprende una o más proteasas u otras enzimas de disociación de tejidos. En una realización específica, una placenta o porción de la misma (p.ej., membrana amniótica, amnios y corion, lóbulo o cotiledón placentario, o combinación de cualquiera de los anteriores) se coloca a 25-37 °C, y se incuba con una o más enzimas de disociación de tejidos en 200 mL de un medio de cultivo durante 30 minutos. Las células del perfundido se recogen, se colocan a 4 °C, y se lavan con una mezcla de inhibidores fría que comprende EDTA 5 mM, ditiotritol 2 mM y beta-mercaptoetanol 2 mM. Las células madre se lavan tras varios minutos con una composición de recogida de células madre fría (p.ej., 4 °C) descrita en otra parte en la presente memoria.

Se apreciará que la perfusión mediante el uso del método de la bandeja, 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 comprenden una población mixta de células placentarias de origen tanto fetal como materno. En contraste, la perfusión únicamente a través de la vasculatura placentaria, mediante la cual se hace pasar el líquido de perfusión a través de uno o dos vasos placentarios y se recoge únicamente a través de el/los vaso(s) restante(s), da como resultado la recogida de una población de células placentarias casi exclusivamente de origen fetal.

#### 4.3.5 Aislamiento, Clasificación, y Caracterización de Células Placentarias

Las células madre de placenta de mamífero, obtenidas mediante perfusión o digestión enzimática, se pueden purificar inicialmente (es decir, aislarlas) de otras células mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Tal centrifugación puede seguir cualquier protocolo habitual con respecto a la velocidad de centrifugación, etc. En una realización, por ejemplo, las células recogidas de la placenta se recuperan del perfundido mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, lo que separa las células, p.ej., de los restos y plaquetas contaminantes. En otra realización, el perfundido placentario se concentra hasta alrededor de 200 ml, se coloca cuidadosamente en una capa sobre Ficoll, y se centrifuga a alrededor de 1100 x g durante 20 minutos a 22 °C, y la capa de células de la interfase de baja densidad se recoge para su procesamiento posterior.

Los sedimentos celulares se pueden resuspender en una composición nueva de recogida de células madre, o un medio adecuado para el mantenimiento de las células madre, p.ej., medio IMDM exento de suero que contiene 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY). La fracción de células mononucleares totales se puede aislar, p.ej., mediante el uso de Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) según el procedimiento recomendado por el fabricante.

Tal como se usa en la presente memoria, "aislar" las células placentarias, p.ej., las células madre placentarias, significa separar al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las células con las que las células madre están asociadas normalmente en la placenta de mamífero intacta. Una célula madre de un órgano está "aislada" cuando está presente en una población de células que comprende menos del 50% de las células con las que la célula madre está asociada normalmente en el órgano intacto.

Las células placentarias obtenidas mediante perfusión o digestión, por ejemplo, se pueden aislar adicionalmente, o inicialmente, mediante tripsinización diferencial con el uso, p.ej., de una disolución del 0,05% de tripsina con un 0,2% de EDTA (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial es posible, ya que las células placentarias se desprenden en general de las superficies de plástico en alrededor de cinco minutos, mientras las otras poblaciones adherentes requieren en general una incubación de más de 20-30 minutos. Las células placentarias desprendidas se pueden recoger tras la tripsinización y la neutralización de la tripsina, mediante el uso, p.ej., de una disolución neutralizante de tripsina (TNS, Cambrex). En una realización del aislamiento de las células adherentes, se colocan alícuotas, por ejemplo, de alrededor de 5-10 x 10<sup>6</sup> células en varios matraces T-75, preferiblemente matraces T75 revestidos de fibronectina. En tal realización, las células se pueden cultivar con medio de cultivo de células madre mesenquimatosas (MSCGM) (Cambrex) comercialmente disponible, y se colocan en un incubador de cultivo de tejidos (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiran de los matraces lavando con PBS. El PBS se sustituye después por MSCGM. Los matraces preferiblemente se examinan diariamente con respecto a la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y expansión de agrupamientos de células fibroblastoides.

El número y tipo de células recogidas de una placenta de mamífero se puede monitorizar, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular mediante el uso de técnicas de detección de células habituales, tales como citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (p.ej., tinción con anticuerpos específicos de tejido o específicos de marcadores celulares), clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), clasificación de células por activación magnética (MACS), mediante examen de la morfología de las células con el uso de microscopía óptica o confocal, y/o midiendo los cambios en la expresión génica con el uso de métodos muy conocidos en la técnica, tales como PCR y caracterización de la expresión génica. Estas técnicas se pueden usar, además, para identificar las células que son positivas para uno o más marcadores particulares. Por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos hacia CD34, se puede determinar, con el uso de las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; si es así, la célula es CD34<sup>+</sup>. De forma similar, si una célula produce suficiente ARN de OCT-4 para ser detectable mediante RT-PCR, o significativamente más ARN de OCT-4 que una célula diferenciada de manera terminal, p.ej., un fibroblasto, la célula es OCT-4<sup>+</sup>. Los anticuerpos hacia los marcadores de la superficie celular (p.ej., marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de genes específicos de células madre, tales como OCT-4, son muy conocidos en la técnica.

Las células placentarias, especialmente las células que se han aislado mediante separación con Ficoll, adherencia diferencial, o una combinación de ambas, se pueden clasificar mediante el uso de un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS). La clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) es un método muy conocido para separar partículas, lo que incluye células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165). La excitación mediante láser de restos fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de las

partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos o ligandos específicos de los marcadores de la superficie celular se marcan con diferentes marcadores fluorescentes. Las células se procesan a través del clasificador de células, lo que permite la separación de las células basándose en su capacidad de unirse a los anticuerpos usados. Las partículas clasificadas mediante FACS se pueden depositar directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En un esquema de clasificación, las células madre de placenta se clasifican basándose en la expresión, p.ej., de los marcadores CD10, CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD80, CD86, CD90, CD105, CD200, SSEA3, SSEA4, y/o HLA-G. Este se puede llevar a cabo con respecto a procedimientos para seleccionar células madre basándose en sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un sistema de selección por adherencia antes o después de la clasificación basada en la expresión de marcadores. En una realización, por ejemplo, las células se clasifican primero basándose en su expresión de CD34; las células CD34<sup>+</sup> se retienen, y las células que son CD200<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup> se separan de todas las demás células CD34<sup>+</sup>. En otra realización, las células de placenta se clasifican basándose en su expresión de los marcadores CD200 y/o HLA-G; por ejemplo, las células que muestran cualquiera de estos marcadores se aíslan para su uso posterior. Las células que expresan, p.ej., CD200 y/o HLA-G se pueden clasificar adicionalmente, en una realización específica, respecto de su expresión de CD73 y/o CD105, o los epítomos reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o la ausencia de expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, en una realización, las células placentarias se clasifican por la expresión, o ausencia de la misma, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y las células placentarias que son CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup> se aíslan de las otras células placentarias para su uso posterior. En otro sistema de clasificación, las células placentarias se clasifican por la expresión de CD10, CD105 y CD200, y, de la población resultante, se excluyen las células que expresan CD34.

En otra realización, se pueden usar microesferas magnéticas para separar células. Las células se pueden clasificar mediante el uso de una técnica de clasificación de células activada magnéticamente (MACS), un método para separar partículas basándose en su capacidad de unirse a microesferas magnéticas (0,5-100 µm de diámetro). Se puede llevar a cabo una diversidad de modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, que incluyen la adición covalente de un anticuerpo que reconoce de manera específica una molécula superficial o hapteno de una célula particular. Las microesferas se mezclan después con las células para permitir la unión. Las células se hacen pasar después a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcadores de la superficie celular específico. En una realización, estas células se pueden aislar y volver a mezclar después con microesferas magnéticas acopladas a un anticuerpo hacia marcadores adicionales de la superficie celular. Las células se hacen pasar de nuevo a través de un campo magnético, que aísla las células que se han unido a ambos anticuerpos. Tales células se pueden diluir después en placas distintas, tales como placas de microtitulación para el aislamiento clonal.

Las células placentarias también se pueden caracterizar y/o clasificar basándose en la morfología celular y las características del cultivo. Por ejemplo, las células placentarias se pueden caracterizar por tener, y/o seleccionar basándose en, p.ej., un aspecto fibroblastoide en cultivo. Las células placentarias se pueden caracterizar también por tener, y/o se pueden seleccionar, basándose en su capacidad de formar cuerpos de tipo embrioide. En una realización, por ejemplo, las células placentarias que tienen forma fibroblastoide, que expresan CD73 y CD105, y que producen uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo, se aíslan de otras células placentarias. En otra realización, las células placentarias OCT-4<sup>+</sup> que producen uno o más cuerpos embrioides en cultivo se aíslan de otras células placentarias.

En otra realización, las células placentarias se pueden identificar y caracterizar mediante un ensayo de unidades formadoras de colonias. Se conocen en general los ensayos de unidades formadoras de colonias en la técnica, tales como el medio Mesen Cult™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Columbia Británica)

Las células placentarias se pueden analizar con respecto a su viabilidad, capacidad de proliferación, y longevidad mediante el uso de métodos habituales conocidos en la técnica, tales como ensayo de exclusión de azul tripán, ensayo de absorción de diacetato de fluoresceína, ensayo de absorción de yoduro de propidio (para analizar la viabilidad); y ensayo de absorción de timidina, ensayo con MTT de proliferación celular (para analizar la proliferación). La longevidad se puede determinar mediante métodos muy conocidos en la técnica, tales como mediante la determinación del número máximo de duplicaciones de población en un cultivo prolongado.

Las células placentarias también se pueden separar de otras células placentarias mediante el uso de otros métodos conocidos en la técnica, p.ej., el cultivo selectivo de células deseadas (selección positiva), la destrucción selectiva de células indeseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación-descongelación; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación a contracorriente); separación por gravedad simple; distribución a contracorriente; electroforesis; y similares.

#### 4.4 Cultivo de Células Placentarias

##### 4.4.1 Medios de Cultivo

Se pueden usar células placentarias aisladas, o una población de células placentarias, o células o tejido placentario

del que crecen las células placentarias, para iniciar, o sembrar, los cultivos celulares. Las células se transfieren en general a recipientes estériles de cultivo de tejidos sin revestir o revestidos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (p.ej., nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de la membrana extracelular (p.ej., MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

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

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

- 20 El medio de cultivo se puede complementar con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero (p.ej., suero bovino fetal (FBS), preferiblemente alrededor del 2-15% (v/v); suero equino (de caballo) (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferiblemente alrededor del 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 similar a insulina 1 (IGF-1), factor inhibitorio de leucemia (LIF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, que incluyen L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina, y nistatina, solos o en combinación.

#### 4.4.2 Expansión y Proliferación de Células Placentarias

- 30 Una vez que se aíslan las células madre placentarias (p.ej., separadas de al menos un 50% de las células placentarias con las que la célula madre o la población de células madre están asociadas normalmente *in vivo*), la célula madre o la población de células madre se pueden hacer proliferar y expandir *in vitro*. De forma similar, una vez que se producen células madre placentarias, tales células también se pueden hacer proliferar y expandir *in vitro*. Por ejemplo, las células madre placentarias se pueden cultivar en recipientes de cultivo de tejidos, p.ej., placas, matraces, placas multipocillo, o similares, durante un tiempo suficiente para que las células madre placentarias proliferen hasta una confluencia del 70-90%, es decir, hasta que las células madre placentarias y su progenie ocupen un 70-90% del área de la superficie de cultivo del recipiente de cultivo de tejidos.

- 35 Las células madre placentarias se pueden sembrar en recipientes de cultivo a una densidad que permite el crecimiento celular. Por ejemplo, las células madre placentarias se pueden sembrar a una densidad baja (p.ej., alrededor de 1.000 a alrededor de 5.000 células/cm<sup>2</sup>) hasta una densidad alta (p.ej., alrededor de 50.000 o más células/cm<sup>2</sup>). En una realización preferida, las células madre placentarias se cultivan de alrededor del 0 a alrededor del 5 por ciento en volumen de CO<sub>2</sub> en aire. En ciertas realizaciones preferidas, las células madre placentarias se cultivan de alrededor del 2 a alrededor del 25 por ciento de O<sub>2</sub> en aire, preferiblemente alrededor del 5 a alrededor del 20 por ciento de O<sub>2</sub> en aire. Las células madre placentarias se cultivan preferiblemente de alrededor de 25 °C a alrededor de 40 °C, preferiblemente a 37 °C. Las células madre placentarias se cultivan preferiblemente en un incubador. El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, mediante el uso de un biorreactor. Las células madre placentarias se cultivan preferiblemente con un estrés oxidativo bajo (p.ej., con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína, o similares).

- 40 Una vez que se obtiene una confluencia del 70%-90%, se puede realizar un pase con las células madre placentarias. Por ejemplo, las células se pueden tratar enzimáticamente, p.ej., tripsinizarlas, mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica, para separarlas de la superficie de cultivo de tejidos. Después de retirar las células madre placentarias pipeteando y contando las células, alrededor de 20.000-100.000 células madre, preferiblemente alrededor de 50.000 células madre placentarias, se someten a un pase en un recipiente de cultivo nuevo que contiene medio de cultivo nuevo. En general, el medio nuevo es el mismo tipo de medio del que se retiraron las células madre. En la presente memoria se proporcionan poblaciones de células madre placentarias que se han sometido a pases al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, o 20 veces, o más, y combinaciones de las mismas.

#### 4.5 Conservación de Células Madre Placentarias

Las células madre placentarias se pueden conservar, es decir, colocar en condiciones que permiten el

almacenamiento a largo plazo, o condiciones que inhiben la muerte celular, p.ej., mediante apoptosis o necrosis.

Las células madre placentarias se pueden conservar mediante el uso, p.ej., de una composición que comprende un inhibidor de la apoptosis, inhibidor de la necrosis y/o un perfluorocarbono de transporte de oxígeno, como se describe en la solicitud provisional de EE.UU. relacionada nº 60/754.969, titulada "Composición Mejorada para la Recogida y Conservación de Células Placentarias y Métodos de Uso de la Composición", presentada el 25 de diciembre de 2005.

En una realización, en la presente memoria se proporciona un método de conservación de células madre placentarias que comprende poner en contacto dichas células madre placentarias con una composición de recogida de células madre que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono de transporte de oxígeno, en el que dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células madre placentarias, en comparación con una población de células madre placentarias 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 una realización más específica, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación o proliferación de dichas células madre placentarias. En otra realización, dicha composición de recogida de células madre comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono de transporte de oxígeno en fases diferentes. En otra realización, dicha composición de recogida de células madre comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono de transporte de oxígeno en una emulsión. En otra realización, la composición de recogida de células madre comprende además un emulsionante, p.ej., lecitina. En otra realización, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre alrededor de 0 °C y alrededor de 25 °C en el momento de entrar en contacto con las células madre. En otra realización más específica, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre alrededor de 2 °C y 10 °C, o entre alrededor de 2 °C y alrededor de 5 °C, en el momento de entrar en contacto con las células madre. En otra realización más específica, dicha puesta en contacto se lleva a cabo durante el transporte de dichas células madre placentarias. En otra realización más específica, dicha puesta en contacto se lleva a cabo durante la congelación y descongelación de dicha población de células madre.

En otra realización, las células madre placentarias se pueden conservar mediante un método que comprende poner en contacto dichas células madre placentarias con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto de conservación de órganos, en el que dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis de las células madre placentarias, en comparación con las células madre placentarias que no se han puesto en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, el compuesto de conservación de órganos es la disolución UW (descrita en la patente de EE.UU. nº 4.798.824; también conocido como ViaSpan; Véase también Southard *et al.*, *Transplantation* 49(2):251-257 (1990)) o una disolución descrita en Stern *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.552.267. En otra realización, dicho compuesto de conservación de órganos es hidroxietil almidón, ácido lactobiónico, rafinosa, o una combinación de los mismos.

En otra realización, las células madre placentarias para el uso en la producción de células madre placentarias se ponen en contacto con una composición de recogida de células madre que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono de transporte de oxígeno, un compuesto de conservación de órganos, o una combinación de los mismos, durante la perfusión. En otra realización, dichas células madre placentarias para el uso en la producción de células madre placentarias se ponen en contacto durante un proceso de disociación de tejidos, p.ej., digestión enzimática. En otra realización, las células placentarias se ponen en contacto con dicho compuesto de recogida de células madre tras la recogida mediante perfusión, o tras la recogida mediante disociación de tejidos, p.ej., digestión enzimática.

En general, durante la recogida, enriquecimiento y aislamiento de las células madre placentarias, es preferible minimizar o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y al estrés mecánico. En otra realización del método, por lo tanto, las células madre placentarias para el uso en la producción de células madre placentarias se exponen a condiciones hipóxicas durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, en el que una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración normal de oxígeno en la sangre. En una realización más específica, dichas células madre placentarias se exponen a dichas condiciones hipóxicas durante menos de dos horas durante dicha conservación. En otra realización más específica, dichas células madre placentarias se exponen a dichas condiciones hipóxicas durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no se exponen a condiciones hipóxicas, durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento. En otra realización específica, dichas células madre placentarias no se exponen a estrés de cizallamiento durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento.

Las células madre placentarias, así como las células madre placentarias a usar para producir células madre placentarias, descritas en la presente memoria se pueden crioconservar, p.ej., en un medio de crioconservación en recipientes pequeños, p.ej., ampollas. El medio de crioconservación adecuado incluye, pero sin limitación, un medio de cultivo que incluye, p.ej., medio de cultivo, o medio de congelación de células, por ejemplo un medio de congelación de células disponible comercialmente, p.ej., C2695, C2639 o C6039 (Sigma). En una realización específica, el medio de congelación de células comprende dextrano (p.ej., dextrano 40) y DMSO (sulfóxido de dimetilo). El medio de crioconservación comprende preferiblemente DMSO (sulfóxido de dimetilo), a una

concentración, p.ej., de alrededor del 10% (v/v). El medio de criopreservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, Plasmalyte, metilcelulosa con o sin glicerol. Las células madre se enfrían preferiblemente a alrededor de 1 °C/min durante la criopreservación. Una temperatura de criopreservación preferida es de alrededor de -80 °C a alrededor de -180 °C, preferiblemente alrededor de -125 °C a alrededor de -140 °C. Las células

5  
criopreservadas se pueden transferir a nitrógeno líquido antes de descongelarlas para su uso. En ciertas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado alrededor de -90 °C, se transfieren a un área de almacenamiento en nitrógeno líquido. Las células criopreservadas se descongelan preferiblemente a una temperatura de alrededor de 25 °C a alrededor de 40 °C, preferiblemente a una temperatura de alrededor de 37 °C.

#### 4.6 Composiciones que Comprenden Células Placentarias

10 Los métodos proporcionados en la presente memoria pueden usar composiciones que comprenden las células madre placentarias o poblaciones de células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria, que se pueden combinar con cualquier compuesto, composición o dispositivo fisiológicamente aceptable o médicamente aceptable.

##### 4.8.1 Células Placentarias Criopreservadas

15 Las células placentarias proporcionadas en la presente memoria se pueden conservar, por ejemplo criopreservar, para su uso posterior. Los métodos para la criopreservación de células, tales como células madre, son muy conocidos en la técnica. Las células madre placentarias se pueden preparar en una forma que sea fácilmente administrable a un sujeto. Por ejemplo, las células madre placentarias descritas en la presente memoria se pueden

20 contener en un recipiente que sea adecuado para el uso médico. Tal recipiente puede ser, por ejemplo, una bolsa de plástico estéril, matraz, frasco, vial, u otro recipiente desde el cual se pueda dispensar fácilmente la población de células placentarias. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico médicamente aceptable adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El recipiente es preferiblemente uno que permite la criopreservación de las células madre placentarias.

25 Las células madre placentarias criopreservadas pueden comprender células madre placentarias derivadas de un único donante, o de múltiples donantes. Las células madre placentarias pueden tener un HLA completamente compatible respecto de un receptor deseado, o un HLA parcialmente o completamente incompatible.

Así, en una realización, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende células madre placentarias en un recipiente. En una realización específica, las células madre placentarias están en un medio que comprende dextrano y DMSO. En una realización específica, las células madre placentarias están criopreservadas,

30 o se han criopreservado. En otra realización específica, el recipiente es una bolsa, matraz, vial o frasco. En una realización más específica, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. En una realización más específica, dicha bolsa es adecuada para, permite o facilita la administración intravenosa de dichas células madre placentarias. La bolsa puede comprender múltiples espacios o compartimentos que están interconectados para permitir la mezcla de las células madre placentarias y otra u otras disoluciones, p.ej., un fármaco, antes o durante la administración. En

35 otra realización específica, la composición comprende uno o más compuestos que facilitan la criopreservación de la población de células madre combinadas. En otra realización específica, dichas células madre placentarias están contenidas en una disolución acuosa fisiológicamente aceptable. En una realización más específica, dicha disolución acuosa fisiológicamente aceptable es una disolución de NaCl 0,9 N. En otra realización específica, dichas células madre placentarias tienen un HLA compatible respecto de un receptor de dichas células madre placentarias. En otra

40 realización específica, dichas células madre placentarias tienen un HLA al menos parcialmente incompatible respecto de un receptor de dichas células madre placentarias. En otra realización específica, dichas células madre placentarias son de una diversidad de donantes.

##### 4.8.2 Composiciones Farmacéuticas

45 Las poblaciones de células madre placentarias aisladas, o las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas, se pueden formular en composiciones farmacéuticas para el uso *in vivo*, p.ej., en los métodos proporcionados en la presente memoria. Tales composiciones farmacéuticas comprenden células madre placentarias, o una población de células que comprende células madre placentarias aisladas, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, p.ej., una solución salina u otra disolución fisiológicamente aceptable aceptada para la administración *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las células madre placentarias aisladas

50 descritas en la presente memoria pueden comprender cualquiera, o cualquier combinación, de las poblaciones de células madre placentarias aisladas, o las células madre placentarias aisladas, descritas en otra parte en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células aisladas fetales, maternas, o tanto fetales como maternas. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender además células madre placentarias aisladas obtenidas de un único sujeto, cordón umbilical o placenta, o de una

55 diversidad de sujetos, cordones umbilicales o placentas. Se puede formular cualquiera de las células madre placentarias, descritas en otra parte en la presente memoria, en una composición farmacéutica, como se describe más adelante. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria comprenden células madre placentarias y un agente anti-trombótico (p.ej., dextrano) y/o un agente anti-inflamatorio (p.ej., DMSO). En otra realización específica, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la



presente memoria comprenden células madre placentarias y un agente anti-trombótico (p.ej., dextrano) y/o un agente anti-inflamatorio (p.ej., DMSO).

5 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender cualquier número de células madre placentarias aisladas. Por ejemplo, una única dosis unitaria de células madre placentarias aisladas puede comprender, en diversas realizaciones, alrededor de, al menos, o como máximo  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más células aisladas.

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

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

20 En ciertas realizaciones, las células madre placentarias se pueden encapsular, p.ej., en alginato, antes o después de la criopreservación. En algunas otras realizaciones, se pueden combinar las células madre placentarias con plasma rico en plaquetas, p.ej., para aplicaciones de inyección local o administración local. En realizaciones específicas, el plasma rico en plaquetas es plasma rico en plaquetas autólogo, p.ej., autólogo respecto del sujeto al que se administran las células madre placentarias. En otras realizaciones específicas, el plasma rico en plaquetas es alogénico respecto del sujeto al que se le administran las células madre placentarias. En otra realización específica, dicho plasma rico en plaquetas se obtiene de un perfundido placentario. En otras realizaciones específicas, la proporción volumen : volumen de células madre placentarias respecto del plasma rico en plaquetas de la composición, o la proporción entre el número de células madre placentarias y el número de plaquetas, es de  
25 alrededor de 10:1 y 1:10; entre alrededor de 100:1 y 1:100; o es de alrededor de 1:1.

En una realización, la composición farmacéutica comprende células placentarias aisladas que son sustancialmente, o completamente, de origen no materno, es decir, tienen el genotipo fetal; p.ej., al menos alrededor del 90%, 95%, 98%, 99% o alrededor del 100% son de origen no materno.

30 En una realización específica, la composición farmacéutica comprende además células madre que no se obtienen de una placenta.

Las células madre placentarias aisladas de las composiciones, p.ej., composiciones farmacéuticas, proporcionadas en la presente memoria, pueden comprender células madre placentarias derivadas de un único donante, o de múltiples donantes. Las células placentarias aisladas pueden tener un HLA completamente compatible respecto de un receptor deseado, o un HLA parcialmente o completamente incompatible.

#### 35 4.9 Matrices que Comprenden Células Placentarias

En la presente memoria se proporcionan además matrices, hidrogeles, armazones, y similares que comprenden células madre placentarias. Las células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria se pueden sembrar sobre una matriz natural, p.ej., un biomaterial placentario tal como un material de membrana amniótica. Tal material de membrana amniótica puede ser, p.ej., membrana amniótica disecada directamente de una placenta de  
40 mamífero; membrana amniótica fijada o tratada térmicamente, membrana amniótica sustancialmente seca (es decir, <20% de  $H_2O$ ), membrana coriónica, membrana coriónica sustancialmente seca, membrana amniótica y coriónica sustancialmente seca, y similares. Los biomateriales placentarios preferidos sobre los que se pueden sembrar las células madre placentarias se describen en Hariri, publicación de solicitud de EE.UU. n° 2004/0048796.

45 Las células placentarias proporcionadas en la presente memoria se pueden suspender en una disolución de hidrogel adecuada, p.ej., para inyección. Los hidrogeles adecuados para tales composiciones incluyen los péptidos auto-ensamblables, tales como RAD16. Las células madre placentarias también se pueden combinar, p.ej., con alginato o plasma rico en plaquetas, u otras matrices que contienen fibrina, para inyección local. En una realización, se puede dejar que una disolución de hidrogel que comprende células madre placentarias se endurezca, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tiene las células dispersadas en ella para la implantación. Las células madre  
50 placentarias de tal matriz también se pueden cultivar de forma que las células se expandan mitóticamente antes de la implantación. El hidrogel puede ser, p.ej., un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula por medio de enlaces covalentes, iónicos, o de hidrógeno para crear una estructura de red abierta tridimensional que retiene las moléculas de agua para formar un gel. Los materiales que forman hidrogeles incluyen polisacáridos tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfacinas, y poliácridatos, que se reticulan de manera iónica, o polímeros  
55 en bloque tales como copolímeros en bloque de poli(óxido de etileno)-polipropileno glicol, que se reticulan mediante la temperatura o el pH, respectivamente. En ciertas realizaciones, el hidrogel o la matriz es biodegradable.

En ciertas realizaciones, la matriz comprende un gel polimerizable *in situ* (véase, p.ej., la publicación de solicitud de

patente de EE.UU. 2002/0022676; Anseth *et al.*, *J. Control Release*, 78(1-3):199-209 (2002); Wang *et al.*, *Biomaterials*, 24(22):3969-80 (2003).

En ciertas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en las disoluciones acuosas, tales como agua, disoluciones salinas tamponadas, o disoluciones en alcohol acuoso, que tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Los ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que se pueden hacer reaccionar con cationes son poli(fosfacenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo), y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. También se pueden usar copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados mediante la reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de éter vinílico. Los ejemplos de grupos ácidos son grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos de alcohol halogenado (preferiblemente fluorado), grupos OH fenólicos, y grupos OH ácidos.

Las células madre placentarias se pueden sembrar en una estructura o armazón tridimensional e implantarlas *in vivo*. Tal estructura se puede implantar en combinación con uno o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que estimulan la formación de tejido o que incrementan o mejoran de otra manera la práctica de los métodos descritos en otra parte en la presente memoria.

Los ejemplos de armazones que se pueden usar en los métodos descritos en la presente memoria incluyen paños sin tejer, espumas porosas, o péptidos autoensamblables. Se pueden formar paños sin tejer mediante el uso de fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácido glicólico y ácido láctico (p.ej., PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Las espumas, compuestas, p.ej., de un copolímero de poli( $\epsilon$ -caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas mediante procesos tales como liofilización (véase, p.ej., la pat. de EE.UU. n° 6.355.699), también se pueden usar como armazón.

En una realización específica, los armazones usados en los métodos descritos en la presente memoria no consisten en colágeno, p.ej., colágeno placentario. En otra realización específica, los armazones usados en los métodos descritos en la presente memoria no comprenden colágeno, p.ej., colágeno placentario.

En otra realización, el armazón es, o comprende, un armazón nanofibroso, p.ej., un armazón nanofibroso electrohilado. En una realización más específica, dicho armazón nanofibroso comprende poli(ácido L-láctico) (PLLA), colágeno tipo I, un copolímero de fluoruro de vinilideno y trifluoroetileno (PVDF-TrFE), poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(L-lactida-co- $\epsilon$ -caprolactona) [P(LLA-CL)] (p.ej., 75:25), y/o un copolímero de poli(3-hidroxitbutirato-co-3-hidroxisvalerato) (PHBV) y colágeno tipo I. Los métodos de producción de armazones nanofibrosos, p.ej., armazones nanofibrosos electrohilados, se conocen en la técnica. Véase, p.ej., Xu *et al.*, *Tissue Engineering* 10(7):1160-1168 (2004); Xu *et al.*, *Biomaterials* 25:877-886 (2004); Meng *et al.*, *J. Biomaterials Sci., Polymer Edition* 18(1):81-94 (2007).

Las células madre placentarias descritas en la presente memoria también se pueden sembrar sobre, o poner en contacto con, un material cerámico fisiológicamente aceptable que incluye, pero sin limitación, mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri-, y tetra-fosfato de calcio, hidroxiapatito, fluoroapatitos, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de calcio y magnesio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS®, y mezclas de los mismos. Los materiales cerámicos biocompatibles porosos comercialmente disponibles en la actualidad incluyen SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canadá), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Suiza), y productos de injertos óseos de colágeno mineralizado tales como HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITOSS®, RHAUSS™, y CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). La estructura puede ser una mezcla, combinación o composición de materiales naturales y/o sintéticos.

En otra realización, las células madre placentarias se pueden sembrar sobre, o poner en contacto con, un fieltro, que puede estar compuesto, p.ej., de un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible tal como copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL, o ácido hialurónico.

Las células madre placentarias descritas en la presente memoria se pueden sembrar, en otra realización, sobre armazones de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Tales armazones de espuma se pueden moldear en una forma útil. En ciertas realizaciones, la estructura se trata, p.ej., con ácido acético 0,1 M seguido de incubación en polilisina, PBS, y/o colágeno, antes de la inoculación de las células placentarias, para incrementar la unión de las células. Se pueden modificar las superficies externas de una matriz para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como revistiendo de plasma la matriz, o mediante la adición de una o más proteínas (p.ej., colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (p.ej., sulfato de heparina, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, etc.), una matriz celular, y/u otros materiales tales como, pero sin limitación, gelatina, alginatos, agar, agarosa, y gomas vegetales, y similares.

En ciertas realizaciones, el armazón comprende, o se trata con, materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden estimular y mantener el crecimiento endotelial, la migración, y el depósito de matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero sin limitación, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno Tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE, y siliconas de poliuretano urea segmentada, tales como PURSPAN™ (The Polymer Technology

Group, Inc., Berkeley, Calif). El armazón también puede comprender agentes anti-trombóticos tales como heparina; los armazones también se pueden tratar para alterar la carga superficial (p.ej., mediante un revestimiento con plasma) antes de sembrar las células madre placentarias.

**5. Ejemplos**

5 5.1 Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra que se pueden usar células madre placentarias en el tratamiento de una lesión renal aguda.

5.1.1 Materiales y Métodos

5.1.1.1 Diseño del Estudio

10 Se asignaron ratas macho Sprague-Dawley (BioLasco, Taiwán), que pesaban de 250 a 280 g, a uno de seis grupos de tratamiento, como se resume en la Tabla 1, a continuación.

TABLA 1

Grupo	Condición	Vía	Momento de Dosificación (tras I-R)	Dosis (x 10 <sup>6</sup> células/sujeto)	Número de Sujetos
1	Control Simulado	N/A	N/A	-	8
2	I-R + PL	IV	Inmediatamente	-	8
3	I-R + FM	IV	Inmediatamente	-	8
4	I-R + células madre placentarias en FM	IV	Inmediatamente	6	8
5	I-R + células madre placentarias en PL	IV	Inmediatamente	3	8
6	I-R + células madre placentarias en PL	IV	Inmediatamente	6	8

Control Simulado: Sin isquemia-reperusión (I/R)  
 PL: DMEM (sin rojo fenol)  
 FM: Medio de congelación (DMEM (sin rojo fenol) que comprende dextrano y DMSO)

15 Se indujo la lesión renal aguda (isquemia-reperusión) en los Grupos 2-6 exponiendo la cavidad abdominal de ratas anestesiadas de cada grupo por medio de una incisión en la línea media y cerrando ambas arterias renales durante 45 min. mediante el uso de pinzas vasculares. Los animales de control simulados (Grupo 1) se sometieron a un procedimiento quirúrgico idéntico sin la oclusión de ambas arterias renales. Después de retirar las pinzas renales, se observaron los riñones durante 1 min. adicional para asegurarse del cambio de color que indica la reperusión sanguínea. Se administraron vehículos de control, DMEM ("PL") o medio de congelación (DMEM (sin rojo fenol) que comprendía dextrano y DMSO; "FM"); y células madre placentarias en PL o FM de manera intravenosa  
 20 inmediatamente después de la reperusión o cirugía.

Se determinó el peso corporal de todos los animales de ensayo a las 24 horas y 48 horas antes de la cirugía, justo antes de la cirugía, y a las 24 horas, 48 horas, y 72 horas; y 96 horas después de la cirugía.

25 Se recogieron muestras de orina y sangre antes del procedimiento quirúrgico y a las 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, y 96 horas (sangre solamente) después de la reperusión para la determinación de las concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en la orina y el plasma (kit de ensayo de K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (Toshiba, Japón)), los niveles de creatinina en la orina y el plasma (kit de ensayo de Creatinina (Denka Seiken, Japón)), y los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) (kit de ensayo de BUN (Denka Seiken, Japón)). Se recogieron 0,4 ml de sangre a través de la vena de la cola a las 8 horas, 24 horas, 48 horas, y 72 horas; y se recogieron 2 ml de sangre por medio de la vena cava a las 96 horas.

30 Todos los animales se sacrificaron y se realizó una necropsia en el Día 4 (96 horas) tras la cirugía. En la necropsia, se recogió el riñón derecho, se lavó en solución salina helada y se conservó en formalina tamponada neutra del 10%. Cada uno se cortó longitudinalmente, se procesó en bloques de parafina, se realizaron cortes de 4-6 micras y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E) para el examen histopatológico.

Los datos se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de prueba de Dunnett o prueba t para datos

independientes. La significación se considera a  $p < 0,05$ .

## 5.1.2 Resultados

### 5.1.2.1 Peso Corporal

5 El incremento del peso corporal medio en los animales de control simulado (Grupo 1) fue mínimo (~3%) a las 96 hrs tras el procedimiento quirúrgico en comparación con el peso corporal antes del procedimiento. En los animales con isquemia-reperfusión (Grupos 1-5), independientemente del tratamiento posterior, las pérdidas de peso corporal medio oscilaron entre un 1-10% durante el periodo de 96 hr tras la cirugía. Los animales tratados con células madre placentarias en FM (Grupo 4) o PL a la dosis de  $6 \times 10^6$  células/rata (Grupo 6) tendieron a mostrar un aumento de peso corporal mejorado en comparación con los controles de vehículo correspondientes FM y PL, respectivamente.

### 10 5.1.2.2 Peso de los Riñones

15 El peso de los riñones absoluto y normalizado (suma del peso del riñón izquierdo y derecho normalizado respecto del peso corporal) se incrementó significativamente en todos los animales que se sometieron al procedimiento de isquemia-reperfusión, independientemente del tratamiento posterior, en comparación con el control simulado. Los animales que recibieron células madre placentarias en FM (Grupo 4) parecieron atenuar el incremento del peso de los riñones, y el peso de los riñones normalizado fue significativamente inferior al de los animales tratados con vehículo de control FM.

### 5.1.2.3 Estudio de la Función Renal

#### 5.1.2.3.1 Análisis de Orina y Plasma

20 Se observaron incrementos significativos del volumen de orina en los animales que se sometieron al procedimiento de isquemia-reperfusión en comparación con los controles simulados. Los animales que recibieron  $6 \times 10^6$  células madre placentarias en FM a las 72 hr tras la isquemia-reperfusión mostraron una mejora en el restablecimiento del volumen de orina normal.

25 Los niveles de sodio y potasio en las muestras de orina y plasma de los animales simulados fueron normales y se mantuvieron en un intervalo ajustado a lo largo de la duración del estudio. Los niveles de sodio y potasio en la orina de los animales que se sometieron al procedimiento de isquemia-reperfusión fueron significativamente inferiores a los niveles en los animales simulados en todos los puntos de tiempo examinados, pero todavía estuvieron en el intervalo normal. De forma similar, los niveles de sodio y potasio en el plasma de los animales que se sometieron al procedimiento de isquemia-reperfusión estuvieron en el intervalo normal.

30 Los niveles de creatinina en las muestras de orina de los animales de control simulados siguieron siendo bastante constantes a lo largo del periodo de estudio. En contraste, se observó una reducción significativa de los niveles de creatinina en orina en todos los animales que se sometieron al procedimiento de isquemia-reperfusión, y fue seguida por un restablecimiento gradual hasta un 40-68% de los niveles anteriores a la isquemia-reperfusión. Los animales que recibieron células madre placentarias en FM (Grupo 4) mostraron una recuperación significativamente mejor de los niveles de creatinina en orina a las 48 y 72 hr tras la isquemia-reperfusión en comparación con los animales con isquemia-reperfusión tratados con vehículo FM.

35 Los animales del grupo simulado mantuvieron sus niveles de creatinina plasmática en el intervalo normal en todos los puntos de tiempo examinados, mientras todos los animales que se sometieron al procedimiento de isquemia-reperfusión tuvieron niveles elevados de creatinina plasmática en los primeros puntos de tiempo, alcanzando un máximo a las 24 horas tras la isquemia-reperfusión, y seguido de reducciones graduales de la creatinina plasmática a lo largo del tiempo. Los animales tratados con células madre placentarias en FM (Grupo 4) tuvieron niveles de creatinina plasmática significativamente inferiores que los de los animales tratados con vehículo FM (Grupo 3) en todos los puntos de tiempo medidos tras la isquemia-reperfusión. Los animales tratados con células madre placentarias en PL (Grupos 5 y 6) también mostraron niveles reducidos de creatinina plasmática en comparación con los animales tratados con vehículo PL (Grupo 2), de una manera dependiente de la dosis.

45 Los niveles de BUN de los animales del grupo simulado estuvieron en el intervalo normal a lo largo de todo el periodo de estudio. Los animales que se sometieron al procedimiento de isquemia-reperfusión exhibieron niveles elevados de BUN. Cuando los animales sometidos a isquemia-reperfusión se trataron con las células madre placentarias, se observaron tendencias de mejora en la reducción de los niveles de BUN. Los animales tratados con células madre placentarias en FM (Grupo 4) exhibieron niveles disminuidos de BUN a las 24 hr, 48 hr, y 72 hr tras la isquemia-reperfusión en comparación con los animales tratados con vehículo FM de control (Grupo 3), y las diferencias a las 24 hr y 48 hr fueron estadísticamente significativas. Los niveles de BUN de los animales tratados con células madre placentarias en PL (Grupos 5 y 6) también mostraron una reducción relacionada con la dosis: Los animales del Grupo 5 exhibieron niveles de BUN comparables al grupo tratado con vehículo de control (Grupo 2), mientras los animales del Grupo 6, que recibieron una dosis mayor de células madre placentarias, exhibieron niveles reducidos de BUN en comparación con el grupo de control de vehículo.

## 5.1.2.3.2 Aclaramiento de Creatinina (CCr)

Los animales del grupo de control simulado tuvieron un aclaramiento de creatinina normal a lo largo de todo el periodo de estudio. Los animales que se sometieron al procedimiento de isquemia-reperfusión tuvieron un aclaramiento de creatinina inferior que el de los controles simulados, lo que indica un deterioro de la función renal.

5 Los animales tratados con células madre placentarias en FM (Grupo 4) mostraron una mejora significativa del aclaramiento de creatinina en comparación con los animales que recibieron vehículo FM (Grupo 3) a lo largo de todo el periodo de estudio. Los animales tratados con  $6 \times 10^6$  células madre placentarias en PL (Grupo 6) mostraron un mejor aclaramiento de creatinina que los animales tratados con vehículo de control PL (Grupo 2) en el punto de tiempo de 8 horas.

10 5.1.2.3.3 Excreción Fraccional de  $\text{Na}^+$ 

Los animales del grupo de control simulado mantuvieron su excreción fraccional de  $\text{Na}^+$  (FENa) constantemente en un intervalo normal a lo largo del periodo de estudio. Todos los animales que se sometieron al procedimiento de isquemia-reperfusión exhibieron un porcentaje incrementado de excreción de  $\text{Na}^+$ . En general, el tratamiento de isquemia-reperfusión con células madre placentarias (Grupos 4-6) dio como resultado la reducción de la excreción fraccional de  $\text{Na}^+$ . Los animales tratados con células madre placentarias en FM (Grupo 4) exhibieron una mejora significativa de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en comparación con los animales tratados con vehículo de control FM (Grupo 3) a las 24 hr, 48 hr, y 72 hr tras la isquemia-reperfusión. Los animales tratados con células madre placentarias en PL (Grupos 5 y 6) también mostraron una tendencia de FENa reducida en comparación con los animales tratados con vehículo de control PL (Grupo 2).

## 20 5.1.2.4 Estudio Histopatológico

Las características histológicas más destacadas de la lesión epitelial tubular en los riñones examinados fueron túbulos renales dilatados, hemorragia, material hialino intratubular, infiltrados de células mononucleares intersticiales, y necrosis del epitelio tubular. Los túbulos renales dilatados, la hemorragia, y los infiltrados de células mononucleares fueron ligeramente menos graves en los animales tratados con células madre placentarias (Grupos 4, 5 y 6) en comparación con los controles de vehículo (Grupos 2 y 3). Además, la necrosis del epitelio tubular fue claramente menos frecuente y grave en los animales tratados con células madre placentarias (Grupos 4, 5 y 6) en comparación con los controles de vehículo (Grupos 2 y 3).

## 25 5.1.3 Conclusión

En conclusión, las células madre placentarias en DMEM solo o en medio que comprende dextrano y DMSO (medio de congelación) pueden generar una protección contra el deterioro funcional de los riñones inducido por la lesión por isquemia/reperfusión en ratas, lo que indica que se pueden usar las células madre placentarias en el tratamiento de la lesión renal aguda.

Equivalentes:

35 Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria no están limitados en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. De hecho, diversas modificaciones de las composiciones y métodos además de las descritas serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Tales modificaciones pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Células madre placentarias para el uso en un método de tratamiento de la lesión renal aguda (LRA) en un sujeto que tiene LRA, en el que dicha LRA es el resultado de un traumatismo directo en uno o más de los riñones del sujeto.
- 5 2. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 1, en el que dichas células madre placentarias se administran al sujeto en una cantidad suficiente para provocar una mejora detectable en uno o más síntomas o complicaciones de LRA, o una reducción en la progresión de uno o más síntomas o complicaciones de LRA, en el sujeto.
- 10 3. Las células madre placentarias para el uso en un método de prevención de uno o más síntomas o complicaciones asociados a la lesión renal aguda (LRA) en un sujeto que tiene LRA, en el que dicha LRA es el resultado de un traumatismo directo en uno o más de los riñones del sujeto.
4. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 3, en el que dichas células madre placentarias se administran al sujeto en una cantidad suficiente para prevenir el inicio de uno o más síntomas o complicaciones de LRA en el sujeto.
- 15 5. Las células madre placentarias para el uso de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas células madre placentarias son células madre placentarias CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>.
6. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 5, en el que dichas células madre placentarias expresan OCT-4.
- 20 7. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 5 o 6, en el que dichas células madre placentarias son además CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>.
8. Las células madre placentarias para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que dichas células madre placentarias son además CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>.
- 25 9. Las células madre placentarias para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en las que el síntoma asociado a LRA es fatiga, heces sanguinolentas, halitosis, sabor metálico en la boca, cardenales, temblor de manos, tensión arterial elevada, hemorragias nasales, hipo, convulsiones, disnea, cambios en el patrón de micciones (p.ej., pérdida de la capacidad de orinar con regularidad, o micción frecuente por la noche), pérdida del apetito, cefalea, náuseas y vómitos, latidos irregulares, dolor lumbar (p.ej., provocado por la trombosis de los vasos sanguíneos renales o la inflamación del riñón), sed, vejiga palpable, acumulación de líquido en las extremidades (edema periférico) y los pulmones (edema pulmonar), y/o taponamiento cardiaco.
- 30 10. Las células madre placentarias para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho método da como resultado un incremento de la tasa de filtración glomerular, una disminución del nivel de creatinina en suero, una disminución del nivel de creatinina en orina, un incremento del aclaramiento de creatinina, una disminución del nivel de nitrógeno ureico en sangre (BUN), y/o una disminución de la excreción fraccional de sodio en el sujeto.
- 35 11. Las células madre placentarias para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichas células madre placentarias se administran de manera sistémica, intravenosa, intraarterial, o local.