(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 709 205**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)
A61K 35/50 (2015.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2007** **PCT/US2007/022545**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2008** **WO08051568**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2007** **E 07867275 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018** **EP 2084268**

(54) Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de defectos óseos con poblaciones de células placentarias**

(30) Prioridad:

23.10.2006 US 853971 P
30.10.2006 US 855629 P
28.09.2007 US 997022 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.04.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

EDINGER, JAMES W.;
HARIRI, ROBERT J.;
WANG, JIA-LUN;
YE, QIAN;
LABAZZO, KRISTEN S.;
PEREIRA, MARIAN y
ABRAMSON, SASCHA DAWN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 709 205 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

Métodos y composiciones para el tratamiento de defectos óseos con poblaciones de células placentarias

Campo

En la presente memoria se proporcionan generalmente composiciones que comprenden células madre placentarias para uso en el tratamiento de defectos óseos, y usos de dicha composición en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un defecto óseo. En la presente memoria también se describen células placentarias aisladas, p. ej., perfusado placentario, células madre placentarias adherentes y no adherentes, poblaciones de células madre placentarias, composiciones que comprenden las células madre, métodos para obtener las células madre, métodos para formular composiciones que comprenden las células madre, y métodos para tratar defectos óseos con las células madre y composiciones.

1. Antecedentes

Las células madre humanas son células precursoras totipotenciales o pluripotenciales capaces de generar una variedad de linajes de células humanas maduras. Existe evidencia que demuestra que las células madre pueden emplearse para repoblar, muchos, si no todos, los tejidos y restaurar la funcionalidad fisiológica y anatómica.

Se han caracterizado muchos tipos diferentes de células madre de mamíferos. Véase, p. ej., Caplan *et al.*, Patente U.S. No. 5 486 359 (células madre mesenquimales humanas); Boyse *et al.*, Patente U.S. No. 5 004 681 (células madre y progenitoras hematopoyéticas fetales y neonatales); Boyse *et al.*, U.S. 5 192 553 (lo mismo); Beltrami *et al.*, *Cell* 114(6):763-766 (2003) (células madre cardiacas); Forbes *et al*, *J. Pathol.* 197(4):510-518 (2002) (células madre hepáticas). La sangre del cordón umbilical, y las células nucleadas totales derivadas de la sangre del cordón, se han usado en trasplantes para restaurar, parcialmente o totalmente, la función hematopoyética en pacientes que han sido sometidos a terapia ablativa.

2. Resumen

En un aspecto de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden células madre placentarias $CD200^+$ adherentes para uso en el tratamiento de un defecto óseo en un sujeto, en donde dicha composición se formula para ser implantable o inyectable.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan usos de una composición en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un defecto óseo en un sujeto, en donde dicha composición comprende células madre placentarias $CD200^+$ adherentes, y en donde dicha composición se formula para ser implantable o inyectable.

En determinadas realizaciones, dichas células madre placentarias adherentes son adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$. En otras realizaciones, dichas células madre placentarias adherentes han sido subcultivadas al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces.

En determinadas realizaciones, el defecto óseo es una lesión osteolítica asociada con un cáncer, una fractura ósea, o una médula espinal necesitada de fusión. En una realización particular, dicha lesión osteolítica asociada con cáncer es una lesión osteolítica asociada con mieloma múltiple, cáncer óseo, o cáncer metastásico. En otra realización particular, dicho cáncer es mieloma múltiple. En otra realización, dicho cáncer es cáncer óseo. En otra realización, dicho cáncer es cáncer metastásico.

En determinadas realizaciones, dicha composición se formula para ser inyectable en el sitio de dicho defecto óseo. En otra realización, dicha composición es inyectable y se formula para administración sistémica. En determinadas realizaciones, dicha composición comprende al menos 5×10^6 de dichas células madre placentarias por mililitro. En otra realización, dicha composición comprende un sustrato o matriz implantable.

De aquí en adelante, la referencia a composiciones y/o células madre placentarias para uso en la invención significará composiciones que comprenden células madre placentarias $CD200^+$ adherentes para uso en el tratamiento de defectos óseos o usadas en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de defectos óseos como se ha definido anteriormente.

En la presente memoria se describen células placentarias aisladas, p. ej., perfusado placentario, células madre placentarias adherentes o no adherentes, poblaciones de células madre placentarias, composiciones que comprenden las células, métodos para obtener las células placentarias, métodos para formular las composiciones, y métodos para usar las células para tratar defectos óseos.

En la presente memoria se describen células madre aisladas, y poblaciones de células que comprenden dichas células madre, en donde las células madre están presentes en, y se pueden aislar de, tejido placentario {p. ej., amnios, corion,

cotiledones placentarios, cordón umbilical, etc.), que son útiles en la reparación de defectos óseos. Las células madre placentarias presentan una o más características de una célula madre (p. ej., presentan marcadores asociados con células madre, se replican al menos 10-20 veces en cultivo en un estado no diferenciado, se diferencian en células adultas representativas de las tres capas germinales, etc.), y pueden adherirse a un sustrato de cultivo tisular (p. ej., plástico de cultivo tisular tal como la superficie de una placa de cultivo tisular o placa con múltiples pocillos).

En un ejemplo, en la presente memoria se describe una célula madre placentaria aislada que no es adherente. En determinados casos, la célula madre aislada es $CD34^+$. En determinados casos, la célula madre aislada es $CD44^-$. En determinados casos, la célula madre aislada es $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados casos, la célula madre aislada es $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados casos, la célula madre aislada es $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados casos, la célula madre aislada es $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados casos, la célula madre aislada es $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados casos, la célula madre aislada se ha aislado de una placenta humana por digestión enzimática. En determinados casos, la célula madre aislada se ha aislado de una placenta humana por perfusión. En determinados casos, la célula madre aislada facilita la formación de una matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada.

En otro ejemplo en la presente memoria se describe una población de células placentarias aisladas que no son adherentes. En determinados casos, la población comprende células madre que son $CD34^+$. En determinados casos, la población comprende células madre que son $CD44^-$. En determinados casos, la población comprende células madre que son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados casos, la población comprende células madre que son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados casos, la población comprende células madre que son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados casos, la población comprende células madre que son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados casos, la población comprende células madre que son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados casos, la población comprende células madre, en donde al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados casos, la población comprende células madre, en donde al menos aproximadamente el 90 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados casos, la población ha sido expandida. En determinados casos, la población ha sido subcultivada al menos una vez. En determinados casos, la población ha sido subcultivada al menos cinco veces. En determinados casos, la población ha sido subcultivada al menos diez veces. En determinados casos, la población ha sido subcultivada al menos veinte veces. En determinados casos, la población forma, o facilita la formación de, una matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada.

En otro ejemplo en la presente memoria se describe una población de células madre placentarias aisladas que son $CD34^+$ y $CD44^-$ En determinados casos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados casos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados casos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados casos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados casos, al menos aproximadamente el 70 % de las células madre son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados casos, al menos aproximadamente el 90 % de las células madre son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados casos, la población ha sido expandida. En determinados casos, la población ha sido subcultivada al menos una vez. En determinados casos, la población ha sido subcultivada al menos cinco veces. En determinados casos, la población ha sido subcultivada al menos diez veces. En determinados casos, la población ha sido subcultivada al menos veinte veces. En determinados casos, la población forma, o facilita la formación de, una matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada.

En una realización, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende una célula madre placentaria aislada que es $CD200^+$ para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento. En una realización específica, la célula madre es adherente. En otra realización específica, dicha célula es $CD200^+$ y HLA-G^+. En una realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha célula madre facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides a partir de una población de células placentarias aisladas que comprende células madre placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe una población de células placentarias aisladas que comprende células madre $CD200^+$, HLA-G^+. En un ejemplo específico, dichas células madre son adherentes. En varios casos, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos

aproximadamente el 95 % o más de dichas células placentarias aisladas son células madre $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$. En un ejemplo específico de las poblaciones anteriores, dichas células madre son $CD73^+$ y $CD105^+$. En otro ejemplo específico, dichas células madre son $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En un ejemplo más específico, dichas células madre son $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ y $CD105^+$. En otros ejemplos específicos, dicha población ha sido expandida, p. ej., subcultivada al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces. En otro ejemplo específico, dicha población forma uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultivan bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende una célula madre placentaria aislada que es $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$ para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento. En una realización específica, dicha célula madre es adherente. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $HLA\text{-}G^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En una realización más específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, y $HLA\text{-}G^+$. En otra realización específica, dicha célula madre facilita el desarrollo de uno o más cuerpos semejantes a embrioides a partir de una población de células placentarias aisladas que comprende la célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, la composición para uso en la invención puede comprender una población de células placentarias aisladas que comprende células madre $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$. En una realización específica, dichas células madre son adherentes. En varias realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de dichas células placentarias aisladas son células madre $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$. En una realización específica de dichas poblaciones, dichas células madre son adicionalmente $HLA\text{-}G^+$. En otra realización específica, dichas células madre también son $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dichas células madre son adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En una realización más específica, dichas células madre son adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, y $HLA\text{-}G^+$. En otras realizaciones específicas, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, subcultivada al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces. En otra realización específica, dicha población forma uno o más cuerpos semejantes a embrioides en cultivo bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En la presente memoria también se proporciona una composición que comprende una célula madre placentaria aislada que es $CD200^+$ y $OCT\text{-}4^+$ para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento. En una realización específica, dicha célula madre es adherente. En otra realización específica, la célula madre es adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $HLA\text{-}G^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En una realización más específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ y $HLA\text{-}G^+$. En otra realización específica, dicha célula madre facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides a partir de una población de células placentarias aisladas que comprende células madre placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, la composición para uso en la invención puede comprender una población de células placentarias aisladas que comprende células mare placentarias $CD200^+$, $OCT\text{-}4^+$. En una realización específica, las células madre son adherentes. En varias realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de dichas células placentarias aisladas son células madre $CD200^+$, $OCT\text{-}4^+$. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células madre son adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dichas células madre son $HLA\text{-}G^+$. En otra realización específica, dichas células madre son adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En una realización más específica, dichas células madre son $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ y $HLA\text{-}G^+$. En otras realizaciones específicas, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, ha sido subcultivada al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces. En otra realización específica, dicha población forma uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende una célula madre placentaria aislada que es $CD200^+$, $CD73^+$ y $CD105^+$ y que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre cuando dicha

población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En una realización específica, dicha célula madre es adherente. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $OCT4^+$. En una realización más específica, dicha célula madre es adicionalmente $OCT4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$.

Además, la composición para uso en la invención puede comprender una población de células placentarias aisladas que comprende células madre placentarias $CD200^+$, $CD73^+$, $CD105^+$, en donde dicha población forma uno o más cuerpos semejantes a embrioides bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En una realización específica, dichas células madre son adherentes. En varias realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de dichas células placentarias aisladas son células madre $CD200^+$, $CD73^+$, $CD105^+$. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células madre son adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dichas células madre son adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otra realización específica, dichas células madre son adicionalmente $OCT\text{-}4^+$. En una realización más específica, dichas células madre son adicionalmente $OCT\text{-}4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otras realizaciones específicas, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, ha sido subcultivada al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces.

En la presente memoria se proporciona además una composición que comprende una célula madre placentaria adherente que es $CD200^+$, $CD73^+$, $CD105^+$ y $HLA\text{-}G^+$ para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento. En una realización específica, dicha célula madre es adherente. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $OCT\text{-}4^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es $CD200^+$. En una realización más específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT\text{-}4^+$ y $CD200^+$. En otra realización específica, dicha célula madre facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides a partir de una población de células placentarias aisladas que comprende células madre placentarias en cultivo bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

Además, la composición para uso en la invención puede comprender una población de células placentarias aisladas que comprende células madre placentarias $CD200^+$, $CD73^+$, $CD105^+$ y $HLA\text{-}G^+$. En una realización específica, las células madre son adherentes. En varias realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de dichas células placentarias aisladas son células madre $CD200^+$. $CD73^+$, $CD105^+$ y $HLA\text{-}G^+$. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células madre son adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dichas células madre son adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otra realización específica, dichas células madre son adicionalmente $OCT\text{-}4^+$. En otra realización específica, dichas células madre son $CD200^+$. En una realización más específica, dichas células madre son $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT\text{-}4^+$ y $CD200^+$. En otra realización específica, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, ha sido subcultivada al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces. En otra realización específica, dicha población forma cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En la presente memoria se proporciona además una composición que comprende una célula madre placentaria aislada que es $CD200^+$ y $OCT\text{-}4^+$ para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento y que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En una realización específica, dicha célula madre es adherente. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$, o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es $CD200^+$. En una realización más específica, dicha célula madre es $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, y $CD45^-$.

También la composición para uso en la invención puede comprender una población de células placentarias aisladas que comprende células madre placentarias $CD200^+$ y $OCT\text{-}4^+$, en donde dicha población forma uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En una realización específica, las células madre son adherentes. En varias realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos

aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de dichas células placentarias aisladas son células madre $CD200^+$ y $OCT4^+$. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células madre son adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dichas células madre son adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$, o $CD45^-$. En otra realización específica, dichas células madre son $CD200^+$. En una realización más específica, dichas células madre son $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, y $CD45^-$. En otra realización específica, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, subcultivada al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces.

En la presente memoria se proporciona además una población aislada de las células madre placentarias adherentes para uso en la invención que se produce según un método que comprende perfundir una placenta de mamífero que ha sido drenada de sangre del cordón y perfundida para eliminar la sangre residual; perfundir dicha placenta con una disolución de perfusión; y recoger dicha disolución de perfusión, en donde dicha disolución de perfusión después de la perfusión comprende una población de células placentarias que comprende células madre placentarias; y aislar una pluralidad de dichas células madre placentarias de dicha población de células. En una realización específica, la disolución de perfusión se pasa a través tanto de la vena umbilical como de las arterias umbilicales y se recoge después de que exuda de la placenta. En otra realización específica, la disolución de perfusión se pasa a través de la vena umbilical y se recoge de las arterias umbilicales, o se pasa a través de las arterias umbilicales y se recoge de la vena umbilical.

En la presente memoria se proporciona además una célula madre placentaria aislada para uso en la invención, o población aislada de dichas células madre placentarias, que se describe en la presente memoria que se produce según un método que comprende digerir tejido placentario con una enzima disruptora de tejido para obtener una población de células placentarias que comprende células madre placentarias, y aislar una pluralidad de células madre placentarias del resto de dichas células placentarias. En realizaciones específicas, dicho tejido placentario es una placenta completa, una membrana amniótica, corion, una combinación de amnios y corion, o una combinación de cualquiera de los anteriores. En otra realización específica, la enzima disruptora de tejido es tripsina o colagenasa.

En realizaciones más específicas, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende una célula madre placentaria aislada, que es $CD200^+$, para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento, en donde dicha célula madre expresa uno o más genes a un nivel detectablemente mayor que una célula madre mesenquimal derivada de la médula ósea, en donde dicho uno o más genes son ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ATRS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1 , FLJ10781 , GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1 , IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, y/o ZC3H12A, y en donde dicha célula madre derivada de la médula ósea ha sido sometida a un número de subcultivos en cultivo equivalentes a un número de subcultivos para dicha célula madre placentaria. En una realización más específica, dicha célula madre placentaria expresa ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ATRS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, y ZC3H12A a un nivel detectablemente mayor que una célula madre mesenquimal derivada de la médula ósea.

En realizaciones más específicas, la composición para uso en la invención puede comprender una población de células madre placentarias aisladas, que comprende células madre placentarias $CD200^+$, en donde dicha población de células madre expresa uno o más genes a un nivel detectablemente mayor que una población de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, en donde dicho uno o más genes son ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ATRS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, y/o ZC3H12A, y en donde dicha población de células madre derivadas de la médula ósea ha sido sometida a un número de subcultivos en cultivo equivalentes a un número de subcultivos para dicha célula madre placentaria, y en donde dicha población de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea tiene un número de células equivalente a dicha población de células madre aisladas. En una realización más específica, la población de células madre aisladas expresa ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ATRS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, y ZC3H12A a un nivel detectablemente mayor que dicha población de células madre mesenquimales aisladas derivadas de la médula ósea aisladas.

En la presente memoria también se proporcionan composiciones que comprenden una o más de las células madre placentarias para uso en la invención, en donde las células se han aislado de la placenta. En realizaciones preferidas, dichas composiciones que comprenden dichas células placentarias son útiles para la reparación de defectos óseos. En la presente memoria también se describe una composición que comprende perfusado placentario, o células aisladas de perfusado placentario, p. ej., células nucleadas totales de perfusado placentario.

En un ejemplo, en la presente memoria se describe una composición que comprende perfusado placentario o células de perfusado placentario, p. ej., células nucleadas totales de perfusado placentario.

En la presente memoria se describe además una composición que comprende una célula madre placentaria, en donde dicha célula madre es una célula madre placentaria aislada que no es adherente. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD34^+$. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD44^-$. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, la célula madre se ha aislado de una placenta humana por digestión enzimática. En determinados ejemplos, la célula madre se ha aislado de una placenta humana por perfusión. En determinadas realizaciones, la célula facilita la formación de una matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe una composición que comprende una célula madre placentaria, en donde dicha célula madre es una célula madre aislada que es $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, la célula madre es $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, la célula madre se ha aislado de una placenta humana por digestión enzimática. En determinados ejemplos, la célula madre se ha aislado de una placenta humana por perfusión. En determinadas realizaciones, la célula facilita la formación de una matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada.

En determinadas realizaciones, la composición para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento para dicho tratamiento comprende una célula madre placentaria $CD200^+$ adherente y un compuesto que induce la diferenciación de dicha célula madre en una célula osteogénica. En determinadas realizaciones, dicha composición comprende una célula madre placentaria para uso en la invención, o una población de dichas células madre placentarias, proporcionadas en la presente memoria, y un compuesto que induce la diferenciación de una pluralidad de células madre en dicha población de células madre en células osteogénicas. En determinadas realizaciones, el compuesto es dexametasona o ácido ascórbico.

En determinadas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una composición para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento para dicho tratamiento que comprende una célula madre placentaria aislada, en donde dicha célula madre es $CD200^+$ y HLA-G^+. Dicha célula madre es adherente. En otra realización específica, dicha célula madre también es $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha célula madre también es $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre también es $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En una realización más específica, dicha célula madre es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ y HLA-G^+.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento para dicho tratamiento que comprende una célula madre placentaria aislada, en donde dicha célula madre es $CD73^+$, $CD105^+$ y $CD200^+$. Dicha célula madre es adherente. En otra realización específica, dicha célula madre también es HLA-G^+. En otra realización específica, dicha célula madre también es $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre también es $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre también es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, y HLA-G^+.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento para dicho tratamiento que comprende una célula madre placentaria aislada, en donde dicha célula madre es $CD200^+$ y OCT-4^+. En una realización específica, la célula madre es adherente. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente HLA-G^+. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$, y HLA-G^+.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento para dicho tratamiento que comprende una célula madre placentaria aislada que es $CD200^+$, $CD73^+$ y $CD105^+$, en donde dicha célula madre facilita la formación de un cuerpo semejante a embrioide en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre bajo condiciones que permiten la formación de un cuerpo semejante a embrioide. En una realización específica, la célula madre es adherente. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $OCT\text{-}4^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es $CD200^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es $OCT\text{-}4^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$.

En otra realización más, en la presente memoria se proporciona una composición para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento para dicho tratamiento que comprende una célula madre placentaria aislada que es $CD200^+$, $CD73^+$, $CD105^+$ y $HLA\text{-}G^+$. En una realización específica, la célula madre es adherente. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $OCT\text{-}4^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es $CD200^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es $OCT\text{-}4^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento para dicho tratamiento que comprende una célula madre placentaria aislada que es $CD200^+$ y $OCT\text{-}4^+$, en donde dicha célula madre facilita la formación de un cuerpo semejante a embrioide en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre bajo condiciones que permiten la formación de un cuerpo semejante a embrioide. En una realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es $CD200^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$.

En la presente memoria se proporciona además una composición para uso en el tratamiento de un defecto óseo o usada para producir un medicamento para dicho tratamiento que comprende células madre placentarias $CD200^+$ que expresan uno o más genes a un nivel detectablemente mayor que una célula madre mesenquimal derivada de la médula ósea, en donde dicho uno o más genes se seleccionan del grupo que consiste en ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ATRS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, y ZC3H12A, y en donde dicha célula madre derivada de la médula ósea ha sido sometida a un número de subcultivos en cultivo equivalentes a un número de subcultivos para dicha célula madre placentaria. En una realización más específica de la composición anterior, dichas células madre expresan ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ATRS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDL1M3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, y ZC3H12A a un nivel detectablemente mayor que una población de célula madre mesenquimal derivada de la médula ósea aislada, en donde dicha población de células madre y dicha población de células mesenquimales derivadas de la médula ósea tienen números de células equivalentes.

En otra realización específica, cualquiera de las composiciones anteriores para uso en la invención comprende una matriz. En una realización más específica, dicha matriz es un soporte tridimensional. En otra realización más específica, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina, o vitronectina. En otra realización más específica, la matriz es una membrana amniótica o un biomaterial derivado de membrana amniótica. En otra realización más específica, dicha matriz comprende una proteína de la membrana extracelular. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto sintético. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otra realización más específica, dicho compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, citoquina, anticuerpo, o molécula orgánica de menos de 5000 daltons. En determinadas realizaciones, la matriz es un polímero sintético degradable tal como, por ejemplo, ácido poliláctico o ácido poliglicólico. En determinadas realizaciones, la matriz es un sustrato de soporte implantable. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable se selecciona del grupo que consiste en un sustrato de β-fosfato tricálcico, un sustrato de β-fosfato tricálcico-colágeno, un sustrato de colágeno, un sustrato de fosfato de calcio, un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado, un sustrato de ácido hialurónico, y un sustrato cerámico. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de β-fosfato tricálcico. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de β-fosfato tricálcico-colágeno. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de colágeno. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de fosfato de calcio. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe una composición que comprende medio condicionado por cualquiera de las células madre anteriores, o cualquiera de las poblaciones de células madre anteriores. En un ejemplo específico, cualquiera de dichas composiciones comprende una célula madre que no deriva de una placenta. En un ejemplo más específico, dicha célula madre es una célula madre embrionaria. En otro ejemplo más específico, dicha célula madre es una célula madre mesenquimal. En otro ejemplo más específico, dicha célula madre es una célula madre derivada de la médula ósea. En otro ejemplo más específico, dicha célula madre es una célula progenitora hematopoyética. En otro ejemplo más específico, dicha célula madre es una célula madre somática. En un ejemplo incluso más específico, dicha célula madre somática es una célula madre neural, una célula madre hepática, una célula madre pancreática, una célula madre endotelial, una célula madre cardiaca, o una célula madre muscular.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe una composición que comprende medio condicionado por una célula madre placentaria o población de células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria. En determinados ejemplos, la composición comprende medio condicionado por una población de células, p. ej., una población de células madre, descritas en la presente memoria.

En la presente memoria también se describe un método para producir una población de células que comprende seleccionar células que no se adhieren a un sustrato, y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En determinados casos, el método comprende además seleccionar células que expresan CD34 y no expresan CD44 e incrementar la concentración de, p. ej., aislando dichas células de otras células, para formar una población de células.

En determinados ejemplos, en la presente memoria se describe un método para producir una población de células, que comprende seleccionar células que (a) no se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD34 y no expresan CD44, y (c) facilitan la formación de matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En determinados casos, el sustrato comprende fibronectina.

En determinados ejemplos, el método comprende además seleccionar células que expresan CD9, CD29, CD54, CD90, CD166, o una combinación de los anteriores.

En determinados ejemplos, el método comprende además seleccionar células que expresan CD31, CD34, CD117, CD133, CD200, o una combinación de los anteriores.

En determinados ejemplos, la selección se consigue usando un anticuerpo. En determinados ejemplos, la selección se consigue usando citometría de flujo. En determinados ejemplos, la selección se consigue usando lechos magnéticos. En determinados ejemplos, la selección se consigue por separación celular activada por fluorescencia. En determinados casos, la población de células se expande.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe una población de células madre placentarias no adherentes, en donde dichas células se han criopreservado, y en donde dicha población está contenida en un contenedor. En determinados ejemplos, las células madre son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados casos, las células se han criopreservado, y en donde dicha población está contenida en un contenedor, y en donde dichas células madre forman una matriz mineralizada cuando se cultivan bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada. En determinados casos, el contenedor es una bolsa adecuada para la administración intravenosa de un líquido. En determinados casos, la población comprende 1×10^6 de dichas células madre. En determinados casos, la población comprende 5×10^6 de dichas células madre. En determinados casos, la población comprende 1×10^7 de dichas células madre. En determinados casos, la población comprende 5×10^7 de dichas células madre. En determinados casos, la población comprende 1×10^8 de dichas células madre. En determinados casos, la población comprende 5×10^8 de dichas células madre. En determinados casos, la población comprende 1×10^9 de dichas células madre. En determinados casos, la población comprende 5×10^9 de dichas células madre. En determinados casos, la población comprende 1×10^{10} de dichas células madre. En determinados casos, las células madre se han subcultivado no más de 5 veces. En determinados casos, las células madre se han subcultivado no más de 10 veces. En determinados casos, las células madre se han subcultivado no más de 15 veces. En determinados casos, las células madre se han subcultivado no más de 20 veces. En determinados casos, las células madre se han expandido en dicho contenedor. En determinados casos, la población está contenida en una disolución de NaCl al 0.9 %.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para producir células osteogénicas con la capacidad de mineralizar una matriz, que comprende cultivar una pluralidad de células madre descritas en la presente memoria o una población de células madre aisladas descritas en la presente memoria, bajo condiciones en las que dichas células madre se diferencian en células osteogénicas, siendo dicho cultivo durante un tiempo suficiente para que dichas células osteogénicas produzcan, o faciliten la producción de, cantidades detectables de matriz mineralizada rica en calcio y/o fosfato. En determinados ejemplos, las células osteogénicas producen hueso.

En la presente memoria también se describe un método para formular una matriz, que comprende combinar una población de células madre proporcionadas en la presente memoria con un sustrato de soporte implantable. En determinados ejemplos, las células madre no son adherentes. En determinados ejemplos, las células madre son $CD34^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD44^-$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 70 % de las células madre son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 90 % de las células madre son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, la población comprende 1 x 10^6 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 5 x 10^6 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 1 x 10^7 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 5 x 10^7 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 1 x 10^8 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 5 x 10^8 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 1 x 10^9 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 5 x 10^9 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 1 x 10^{10} de dichas células madre. En determinados ejemplos, las células madre se han subcultivado al menos, aproximadamente, o no más de 5 veces. En determinados ejemplos, las células madre se han subcultivado al menos, aproximadamente, o no más de 10 veces. En determinados ejemplos, las células madre se han subcultivado al menos, aproximadamente, o no más de 15 veces. En determinados ejemplos, las células madre se han subcultivado al menos, aproximadamente, o no más de 20 veces. En determinados ejemplos, la población ha sido expandida.

La composición para uso en la invención se formula para ser implantable. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable se selecciona del grupo que consiste en un sustrato de β-fosfato tricálcico, un sustrato de β-fosfato tricálcico-colágeno, un sustrato de colágeno, un sustrato de fosfato de calcio, un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado, un sustrato de ácido hialurónico, y un sustrato cerámico. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de β-fosfato tricálcico. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de β-fosfato tricálcico-colágeno. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de colágeno. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de fosfato de calcio. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado.

La composición para uso en la invención se formula como una composición inyectable, que comprende combinar las células madre placentarias para uso en la invención con ácido hialurónico o colágeno inyectable. En determinados ejemplos, las células madre no son adherentes. En determinados ejemplos, las células madre son $CD34^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD44^-$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 90 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinadas otras realizaciones, las células madre placentarias son adherentes. En realizaciones específicas, las células madre placentarias son $CD200^+$ y HLA-G^+; $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$; $CD200^+$ y OCT-4^+; $CD200^+$, $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+; $CD200^+$, $CD73^+$ y $CD105^+$ y facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de un cuerpo semejante a embrioide; o $CD200^+$ y OCT-4^+ y facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende la célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides; o cualquier combinación de las mismas. En realizaciones más específicas de las células madre placentarias adherentes para uso en la invención, la célula madre $CD200^+$, HLA-G^+ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ y $CD105^+$; la célula madre $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, y HLA-G^+; la célula madre $CD200^+$, OCT-4^+ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+; la célula madre aislada de la reivindicación 1 , en donde dicha célula madre $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+ es $CD34^-$, $CD45^-$, OCT-4^+ y $CD200^+$; la célula madre $CD73^+$ y $CD105^+$ aislada que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $OCT4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$; y/o la OCT-4^+ aislada y que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, y $CD45^-$. En determinadas realizaciones, las células madre placentarias para uso en la invención han sido expandidas. En determinadas realizaciones, dicha composición comprende ácido hialurónico inyectable. En determinadas realizaciones, la composición comprende colágeno inyectable. En la presente memoria también se describen composiciones que comprenden una población de células madre no adherentes y ácido hialurónico o colágeno inyectable.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende células madre placentarias $CD200^+$ adherentes para uso en un método para tratar defectos óseos en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición implantable o inyectable que comprende una población de células madre proporcionadas en la presente memoria, tratando de esta manera el defecto óseo en el sujeto. En determinadas realizaciones, el defecto óseo es una lesión osteolítica asociada con un cáncer, una fractura ósea, o una médula espinal, p. ej., que necesita fusión. En determinadas realizaciones, la lesión osteolítica está asociada con mieloma múltiple, cáncer óseo, o cáncer metastásico. En determinadas realizaciones, la fractura ósea es una fractura no de unión. En determinados ejemplos, se administra al sujeto una composición implantable que comprende una población de células madre no adherentes. En determinadas realizaciones, una composición implantable se implanta quirúrgicamente, p. ej., en el sitio del defecto óseo. En determinados ejemplos, se administra al sujeto una composición inyectable que comprende una población de células madre no adherentes. En determinadas realizaciones, una composición inyectable se administra quirúrgicamente en la región del defecto óseo. En determinadas realizaciones, la composición inyectable se administra sistémicamente.

En determinados ejemplos, las células madre no son adherentes. En determinados ejemplos, las células madre son $CD34^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD44^-$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 70 % de las células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 90 % de las células son células madre $CD34^+$ y CD44*. En determinados otros ejemplos, las células madre placentarias son adherentes. En ejemplos específicos, las células madre placentarias son $CD200^+$ y HLA-G^+; $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$; $CD200^+$ y OCT-4^+; $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+; $CD73^+$ y $CD105^+$ y facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de un cuerpo semejante a embrioide; u OCT-4^+ y facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende la célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides; o cualquier combinación de las mismas. En ejemplos más específicos de las células madre placentarias no adherentes, la célula madre $CD200^+$, HLA-G^+ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ y $CD105^+$; la célula madre $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, y HLA-G^+; la célula madre $CD200^+$, OCT-4^+ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+; la célula madre aislada de la reivindicación 1 , en donde dicha célula madre $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+ es $CD34^-$, $CD45^-$, OCT-4^+ y $CD200^+$; la célula madre $CD73^+$ y $CD105^+$ aislada que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $OCT4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$; y/o la OCT-4^+ aislada y que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, y $CD45^-$. En determinados ejemplos, la población ha sido expandida.

En la presente memoria se describe además un método para producir una población de células que comprende seleccionar células que a) se adhieren a un sustrato, y b) expresan CD34 y no expresan CD44, y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En determinados ejemplos, el método comprende además aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En determinados ejemplos, el método para producir una población de células comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD34 y no expresan CD44, y (c) facilitan la formación de matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En determinados ejemplos, dicho sustrato comprende fibronectina. En determinados ejemplos, en la presente memoria se describe un método para producir una población de células que comprende seleccionar células que a) no se adhieren a un sustrato, y b) expresan CD34 y no expresan CD44, y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En determinados ejemplos, el método comprende además aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En determinados ejemplos, el método para producir una población de células comprende seleccionar células que (a) no se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD34 y no expresan CD44, y (c) facilitan la formación de matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En determinados ejemplos, dicho sustrato comprende fibronectina. En determinados ejemplos, el método comprende seleccionar células que expresan al menos uno de los siguientes: CD9, CD29, CD54, CD90, CD166, o una combinación de los anteriores. En determinados ejemplos, el método comprende seleccionar células que expresan al menos uno de los siguientes: CD31, CD34, CD117, CD133, CD200, o una combinación de los anteriores.

En determinados casos, la selección se consigue usando un anticuerpo. En determinados casos, la selección se consigue usando citometría de flujo. En determinados casos, la selección se consigue usando lechos magnéticos. En determinados casos, la selección se consigue por separación celular activada por fluorescencia. En determinadas realizaciones, la población de células se expande.

En determinados ejemplos, las células madre son $CD34^+$ y $CD44^-$, en donde las células se han criopreservado, y en donde la población está contenida en un contenedor. En determinados ejemplos, las células se han criopreservado, y en donde dicha población está contenida en un contenedor, y en donde dichas células madre forman una matriz mineralizada cuando se cultivan bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada.

En determinadas realizaciones, la composición para uso en la invención está contenida en un contenedor, en donde el contenedor es una bolsa adecuada para la administración intravenosa de un líquido. En determinadas realizaciones, la composición comprende 1 x 10^6 de dichas células madre adherentes. En determinadas realizaciones, la composición comprende 5 x 10^6 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 1 x 10^7 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 5 x 10^7 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 1 x 10^8 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 5 x 10^8 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 1 x 10^9 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 5 x 10^9 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 1 x 10^{10} de dichas células madre. En determinadas realizaciones, las células madre se han subcultivado no más de 5 veces. En determinadas realizaciones, las células madre se han subcultivado no más de 10 veces. En determinadas realizaciones, las células madre se han subcultivado no más de 15 veces. En determinadas realizaciones, las células madre se han subcultivado no más de 20 veces. En determinadas realizaciones, las células madre han sido expandidas en dicho contenedor. En determinadas realizaciones, dichas células madre están contenidas en una disolución de NaCl al 0.9 %.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para producir células osteogénicas que comprende cultivar una pluralidad de células madre placentarias o una población de células madre placentarias aisladas, bajo condiciones en las que dichas células madre se diferencian en células osteogénicas, siendo dicho cultivo durante un tiempo suficiente para que dichas células osteogénicas produzcan, o faciliten la producción de, cantidades detectables de calcio mineralizado.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para formular una matriz, que comprende combinar una población de células madre placentarias con un sustrato de soporte implantable. En un ejemplo, dichas células madre son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 90 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinadas realizaciones, las células madre son adherentes. En realizaciones específicas, las células madre placentarias adherentes son $CD200^+$ y HLA-G^+; $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$; $CD200^+$ y OCT-4^+; $CD200^+$, $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+; $CD200^+$, $CD73^+$ y $CD105^+$ y facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de un cuerpo semejante a embrioide; o $CD200^+$ y OCT-4^+ y facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende la célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides; o cualquier combinación de las mismas. En realizaciones más específicas de las células madre placentarias adherentes, la célula madre $CD200^+$, HLA-G^+ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ y $CD105^+$; la célula madre $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, y HLA-G^+; la célula madre $CD200^+$, OCT-4^+ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+; la célula madre aislada de la reivindicación 1 , en donde dicha célula madre $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+ es $CD34^-$, $CD45^-$, OCT-4^+ y $CD200^+$; la célula madre $CD73^+$ y $CD105^+$ aislada que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $OCT4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$; y/o la OCT-4^+ aislada y que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, y $CD45^-$. En determinadas realizaciones, la composición comprende 1 x 10^6 de dichas células madre adherentes. En determinadas realizaciones, la composición comprende 5 x 10^6 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 1 x 10^7 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 5 x 10^7 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 1 x 10^8 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 5 x 10^8 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 1 x 10^9 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 5 x 10^9 de dichas células madre. En determinadas realizaciones, la composición comprende 1 x 10^{10} de dichas células madre. En determinadas realizaciones, las células madre se han subcultivado no más de 5 veces. En determinadas realizaciones, las células madre se han subcultivado no más de 10 veces. En determinadas realizaciones, las células madre se han subcultivado no más de 15 veces. En determinadas realizaciones, las células madre se han subcultivado no más de 20 veces. En determinadas realizaciones, las células madre placentarias han sido expandidas.

La composición para uso en la invención se formula para ser implantable. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable se selecciona del grupo que consiste en un sustrato de β-fosfato tricálcico, sustrato de β-fosfato

tricálcico-colágeno, un sustrato de colágeno, un sustrato de fosfato de calcio, un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado, y un sustrato de ácido hialurónico. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de β-fosfato tricálcico. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de β-fosfato tricálcico-colágeno. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de colágeno. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato de fosfato de calcio. En determinadas realizaciones, el sustrato de soporte implantable es un sustrato y/o soporte de colágeno placentario humano mineralizado.

La composición para uso en la invención se formula como una composición inyectable, que comprende combinar las células madre placentarias para uso en la invención con ácido hialurónico o colágeno inyectable. En un ejemplo, dichas células madre son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 90 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, la población ha sido expandida. En determinadas realizaciones, las células madre son células madre placentarias $CD200^+$ adherentes. En determinadas realizaciones, la composición comprende ácido hialurónico inyectable. En determinadas realizaciones, la composición comprende colágeno inyectable. En la presente memoria también se describen composiciones que comprenden una población de células madre no adherentes y ácido hialurónico o colágeno inyectable.

En otro ejemplo más, en la presente memoria se describe un método para tratar defectos óseos en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una composición implantable o inyectable que comprende una población de células madre, en donde dichas células madre son $CD34^+$ y $CD44^-$, tratando de esta manera el defecto óseo en el sujeto. En determinadas realizaciones, el defecto óseo es (a) una lesión osteolítica asociada con un cáncer, (b) una fractura ósea, o (c) una médula espinal que necesita fusión. En determinados ejemplos, la lesión osteolítica está asociada con mieloma múltiple, cáncer óseo, o cáncer metastásico. En determinados ejemplos, la fractura ósea es una fractura no de unión. En determinados ejemplos, se administra al sujeto una composición implantable que comprende una población de células madre no adherentes. En determinadas realizaciones, la composición implantable se implanta quirúrgicamente. En determinados ejemplos, se administra al sujeto una composición inyectable que comprende una población de células madre no adherentes. En determinados ejemplos, la composición inyectable se administra quirúrgicamente en la región del defecto óseo. En determinados ejemplos, la composición inyectable se administra sistémicamente.

En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 90 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, la población ha sido expandida.

En otro ejemplo más, en la presente memoria se describe un método para tratar defectos óseos en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición implantable o inyectable que comprende una población de células madre, en donde dichas células madre son $CD34^-$ y, tratando de esta manera el defecto óseo en el sujeto. En determinados ejemplos, el defecto óseo es (a) una lesión osteolítica asociada con un cáncer, (b) una fractura ósea, o (c) una médula espinal que necesita fusión. En determinados ejemplos, la lesión osteolítica está asociada con mieloma múltiple, cáncer óseo, o cáncer metastásico. En determinados ejemplos, la fractura ósea es una fractura no de unión. En determinados ejemplos, se administra al sujeto una composición implantable que comprende una población de células madre adherentes. En determinados ejemplos, la composición implantable se implanta quirúrgicamente. En determinados ejemplos, se administra al sujeto una composición inyectable que comprende una población de células madre adherentes. En determinados ejemplos, la composición inyectable se administra quirúrgicamente en la región del defecto óseo. En determinados ejemplos, la composición inyectable se administra sistémicamente.

En determinados ejemplos de las células madre placentarias no adherentes, la célula madre $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ y $CD105^+$; la célula madre $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, y $HLA\text{-}G^+$; la célula madre $CD200^+$, $OCT\text{-}4^+$ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ y $HLA\text{-}G^+$; la célula madre aislada de la reivindicación 1, en donde dicha célula madre $CD73^+$, $CD105^+$ y $HLA\text{-}G^+$ es $CD34^-$, $CD45^-$, $OCT\text{-}4^+$ y $CD200^+$; la célula madre $CD73^+$ y $CD105^+$ aislada que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $OCT4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$; y/o la $OCT\text{-}4^+$ aislada y que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, y $CD45^-$. En determinados ejemplos, la población comprende 1×10^6 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población

comprende 5 x 10^6 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 1 x 10^7 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 5 x 10^7 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 1 x 10^8 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 5 x 10^8 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 1 x 10^9 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 5 x 10^9 de dichas células madre. En determinados ejemplos, la población comprende 1 x 10^{10} de dichas células madre. En determinados ejemplos, las células madre se han subcultivado no más de 5 veces. En determinados ejemplos, las células madre se han subcultivado no más de 10 veces. En determinados ejemplos, las células madre se han subcultivado no más de 15 veces. En determinados ejemplos, las células madre se han subcultivado no más de 20 veces. En determinados ejemplos, la población ha sido expandida.

En la presente memoria también se describen métodos para producir poblaciones de células madre derivadas de placenta de mamífero. En un ejemplo, en la presente memoria se describe un método para producir una población de células que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD200 y HLA-G; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para producir una población de células, que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73, CD 105, y CD200; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para producir una población de células, que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD200 y OCT-4; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro ejemplo más, en la presente memoria se describe un método para producir una población de células, que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultivan con una población de células placentarias bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para producir una población de células, que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En la presente memoria también se describe un método para producir una población de células, que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultivan con una población de células placentarias bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En un ejemplo específico de cualquiera de los métodos anteriores, dicho sustrato comprende fibronectina. En otro ejemplo específico, los métodos comprenden seleccionar células que expresan ABC-p. En otro ejemplo específico, los métodos comprenden seleccionar células que presentan al menos una característica específica de una célula madre mesenquimal. En otro ejemplo, dicha característica específica de una célula madre mesenquimal es la expresión de CD29, la expresión de CD44, la expresión de CD90, o la expresión de una combinación de los anteriores. En otro ejemplo de los métodos, dicha selección se consigue usando un anticuerpo. En otro ejemplo, dicha selección se consigue usando citometría de flujo. En otro ejemplo, dicha selección se consigue usando lechos magnéticos. En otro ejemplo, dicha selección se consigue por separación celular activada por fluorescencia. En otro ejemplo de los métodos anteriores, dicha población de células se expande.

En la presente memoria también se describe un método para producir una línea de células madre, que comprende transformar una célula madre con una secuencia de ADN que codifica una proteína que estimula el crecimiento; y exponer dicha célula madre a condiciones que estimulen la producción de dicha proteína que estimula el crecimiento. En un ejemplo específico, dicha proteína que estimula el crecimiento es v-myc, N-myc, c-myc, p53, antígeno T grande de SV40, antígeno T grande de polioma, proteína E1a de adenovirus o E7 de papilomavirus humano. En un ejemplo más específico, dicha secuencia de ADN se puede regular. En un ejemplo más específico, dicha secuencia de ADN se puede regular por tetraciclina. En otro ejemplo, dicha proteína que estimula el crecimiento tiene una actividad que se puede regular. En otro ejemplo, dicha proteína que estimula el crecimiento es un mutante sensible a la temperatura.

En la presente memoria también se describen poblaciones de células madre criopreservadas. Por ejemplo, la composición para uso en la invención puede comprender una población de células madre placentarias adherentes $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$ para uso en la invención, en donde dichas células se han criopreservado, y en donde dicha población está contenida en un contenedor. En la presente memoria también se proporciona dicha composición que comprende una población de células madre placentarias adherentes $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ para uso en la invención, en donde dichas células madre se han criopreservado, y en donde dicha población está contenida en un contenedor. En la presente memoria también se proporciona dicha composición que comprende una población de células madre placentarias adherentes $CD200^+$, $OCT\text{-}4^+$ para uso en la invención, en donde dichas células madre se han criopreservado, y en donde dicha población está contenida en un contenedor. En la presente memoria también se describe una población de células madre $CD73^+$, $CD105^+$, en donde dichas células se han criopreservado, y en donde dicha población está contenida en un contenedor, y en donde dichas células madre facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultivan con una población de células placentarias bajo condiciones que

permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En la presente memoria se describe además una población de células madre $CD73^+$, $CD105^+$, $HLA\text{-}G^+$, en donde dichas células se han criopreservado, y en donde dicha población está contenida en un contenedor. En la presente memoria también se describe una población de células madre $OCT\text{-}4^+$, en donde dichas células se han criopreservado, en donde dicha población está contenida en un contenedor, y en donde dichas células madre facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultivan con una población de células placentarias bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En una realización específica de cualquiera de las poblaciones criopreservadas anteriores para uso en la invención, dicho contenedor es una bolsa. En varias realizaciones específicas, dicha población comprende aproximadamente, al menos, o como máximo 1×10^6 de dichas células madre, 5×10^6 de dichas células madre, 1×10^7 de dichas células madre, 5×10^7 de dichas células madre, 1×10^8 de dichas células madre, 5×10^8 de dichas células madre, 1×10^9 de dichas células madre, 5×10^9 de dichas células madre, o 1×10^{10} de dichas células madre. En otras realizaciones específicas de cualquiera de las poblaciones criopreservadas anteriores para uso en la invención, dichas células madre se han subcultivado aproximadamente, al menos, o no más de 5 veces, no más de 10 veces, no más de 15 veces, o no más de 20 veces. En otra realización específica de cualquiera de las poblaciones criopreservadas anteriores para uso en la invención, dichas células madre han sido expandidas en dicho contenedor.

En la presente memoria se describe además un método para preparar una matriz de colágeno mineralizado, que comprende mineralizar el colágeno y entrecruzar la matriz de colágeno mineralizado. En determinados ejemplos, el colágeno es colágeno placentario. En determinados ejemplos, el colágeno se mineraliza con fosfato de calcio. En determinados ejemplos, el colágeno se entrecruza con éter diglicidil butano diol. En determinados ejemplos, la relación de fosfato de calcio a colágeno en la reacción de mineralización es 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10, o 95:5.

2.1. Definiciones

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "SH2" se refiere a un anticuerpo que se une a un epítopo en el marcador CD105. Así, las células que se refieren como $SH2^+$ son $CD105^+$.

Tal y como se usa 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 refieren como $SH3^+$ y/o $SH4^+$ son $CD73^+$.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "célula madre aislada" significa una célula madre que se separa sustancialmente de otras células no madre del tejido, p. ej., placenta, del que deriva la célula madre. Una célula madre está "aislada" si al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o al menos el 99 % de las células no madre con las que la célula madre está asociada naturalmente se eliminan de la célula madre, p. ej., durante la recogida y/o cultivo de la célula madre.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "población de células aisladas" significa una población de células que se separa sustancialmente de otras células del tejido, p. ej., placenta, del que deriva la población de las células. Una célula madre está "aislada" si al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o al menos el 99 % de las células con las que la población de células, o células de las que deriva la población de células, está asociada naturalmente se elimina de la célula madre, p. ej., durante la recogida y/o cultivo de la célula madre.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "célula madre placentaria" se refiere a una célula madre o célula progenitora que deriva de una placenta de mamífero, independientemente de la morfología, marcadores de la superficie celular, o el número de subcultivos después de un cultivo primario. El término "célula madre placentaria" tal y como se usa en la presente memoria no se refiere, sin embargo, a un trofoblasto. Una célula se considera una "célula madre" si la célula retiene al menos un atributo de una célula madre, p. ej., un marcador o perfil de expresión génica asociado con uno o más tipos de células madre; la capacidad de replicarse al menos 10-40 veces en cultivo, la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales; la ausencia de características de células adultas (es decir, diferenciadas), o semejantes. Los términos "célula madre placentaria" y "célula madre derivada de placenta" pueden usarse indistintamente.

Tal y como se usa en la presente memoria, "perfusado placentario" significa disolución de perfusión que se ha pasado a través de al menos parte de una placenta, p. ej., una placenta humana, p. ej., a través de la vasculatura placentaria, incluyendo una pluralidad de células recogidas por la disolución de perfusión durante el paso a través de la placenta.

Tal y como se usa en la presente memoria, "células de perfusado placentario" significa células nucleadas, p. ej., células nucleadas totales, aisladas de, o que se pueden aislar de, el perfusado placentario.

Tal y 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 para, p. ej., CD73 porque CD73 es detectable en células madre placentarias en una cantidad detectablemente mayor que el fondo (en comparación con, p. ej., un control de isotipo). Una célula también es positiva para un marcador cuando ese marcador puede usarse

para distinguir la célula de al menos otro tipo de célula, o puede usarse para seleccionar o aislar la célula cuanto está presente o se expresa por la célula.

Tal y como se usa en la presente memoria, una "célula osteogénica" es una célula que es capaz bien de depositar hidroxiapatito, el componente principal del hueso, o diferenciarse en una célula que es capaz de depositar hidroxiapatito. Una "célula osteogénica" se contempla específicamente como que engloba una célula referida de forma ordinaria como un osteoblasto o un osteocito.

Tal y como se usa en la presente memoria, una "matriz" se refiere a una sustancia tridimensional que se caracteriza por lacunae dispersadas a lo largo de la sustancia. Las lacunae son adecuadas, por ejemplo, para el crecimiento de células, p. ej., células madre, células madre adherentes derivadas de placenta, y/o células osteogénicas, en la matriz. Las matrices ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, un sustrato de β-fosfato tricálcico, un sustrato de β-fosfato tricálcico-colágeno, un sustrato de colágeno, un sustrato de fosfato de calcio, un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado, un sustrato de ácido hialurónico, y un sustrato cerámico. Preferiblemente, la matriz puede mineralizarse por una célula osteogénica presente en las lacunae de la matriz.

3. Descripción breve de las figuras

FIG. 1: Viabilidad de las células madre placentarias de perfusión (A), amnios (B), corion (C), placa amnios-corion (D) o cordón umbilical (E). Los números en el eje de las X designan la placenta de la que se obtuvieron las células madre.

FIG. 2: Porcentaje de células HLA $ABC^-/CD45^-/CD34^-/CD133^+$ de perfusión (A), amnios (B), corion (C), placa amnios-corion (D) o cordón umbilical (E) según se determina por FACSCalibur. Los números en el eje de las X designan la placenta de la que se obtuvieron las células madre.

FIG. 3: Porcentaje de células HLA $ABC^-/CD45^-/CD34^-/CD133^+$ de perfusión (A), amnios (B), corion (C), placa amnios-corion (D) o cordón umbilical (E), según se determina por FACS Aria. Los números en el eje de las X designan la placenta de la que se obtuvieron las células madre.

FIG. 4: Expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de perfusado placentario.

FIG. 5: Expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de amnios.

FIG. 6: Expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de corion.

FIG. 7: Expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de placa amnios-corion.

FIG. 8: Expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de cordón umbilical.

FIG. 9: Expresión promedio de la expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de perfusión (A), amnios (B), corion (C), placa amnios-corion (D) o cordón umbilical (E).

FIG. 10: Evolución temporal de cultivos para amnios/corion (AC), cordón umbilical (UC), célula madre derivada de la médula ósea (BM-MSC) y líneas celulares de fibroblastos dérmicos humanos (NHDF) usadas en este estudio. Todos los cultivos se crecieron y propagaron usando las mismas densidades de siembra y subcultivo. Los círculos indican qué cultivos se usaron para el aislamiento del ARN. Los cultivos tardíos se recogieron justo antes de la senescencia. Dos cultivos de UC se recogieron a las 38 duplicaciones (UC-38) para comparar el efecto de la tripsinización en la expresión génica. Todos los demás cultivos se lisaron directamente en sus matraces de cultivo antes del aislamiento del ARN.

FIG. 11: Gráfica de líneas de los niveles de expresión relativa de 8215 genes en amnios/corion (AC), cordón umbilical (UC), célula madre derivada de la médula ósea (BM-MSC) y células fibroblastos dérmicos (DF) humanos. El número asociado con la designación de cada línea celular en el eje de las X indica el número de días que se cultivó la línea celular antes de la evaluación de los niveles de expresión génica. La gráfica se generó a partir de los datos de expresión del ARN analizados por el software GeneSpring. Se usó AC-03 como la condición seleccionada.

FIG. 12: Subconjunto de la lista de todos los genes que muestra los genes sobreexpresados ≥ 6 veces en AC-03 para amnios/corion (AC), cordón umbilical (UC), célula madre derivada de la médula ósea (BM-MSC) y células de fibroblastos dérmicos (DF) humanos. El número asociado con la designación de cada línea celular en el eje de las X

indica el número de días que se cultivó la línea celular antes de la evaluación de los niveles de expresión génica. La gráfica se generó a partir de los datos de expresión del ARN analizados por el software GeneSpring. Se usó AC-03 como la condición seleccionada.

FIG. 13: Genes específicos de célula madre placentaria o específicos de célula madre del cordón umbilical encontrados por filtración de las veces de cambio para amnios/corion (AC), cordón umbilical (UC), célula madre derivada de la médula ósea (BM-MSC) y células de fibroblastos dérmicos (DF) humanos. El número asociado con la designación de cada línea celular en el eje de las X indica el número de días que se cultivó la línea celular antes de la evaluación de los niveles de expresión génica. La gráfica se generó a partir de los datos de expresión del ARN analizados por el software GeneSpring. Se usó AC-03 como la condición seleccionada.

FIG 14: Actividad de fosfatasa alcalina tanto de células madre placentarias (FIG 14A) como de células madre mesenquimales (FIG 14B) cultivadas en dos formulaciones de medio diferentes.

FIG 15: Mineralización de las células madre placentarias (FIG 15A) cultivadas en dos formulaciones de medio diferentes.

FIG 16: Depósitos de minerales por células madre placentarias inducidas en medio OS, pero no en medio Anthro1B.

FIG 17: Evolución temporal del crecimiento de las células madre placentarias y células madre mesenquimales crecidas en dos soportes diferentes.

FIG 18: Micrografías electrónicas de barrido (20x) de las células madre placentarias y células madre mesenquimales crecidas en medio OS y Anthro1B en un sustrato de β-fosfato tricálcico.

FIG 19: Micrografías electrónicas de barrido (5000x) de las células madre placentarias y células madre mesenquimales crecidas en medio OS y Anthro1B en un sustrato de β-fosfato tricálcico.

FIG 20: Tinción con rojo de Alizarina de células madre mesenquimales y células madre obtenidas de células de placenta humana perfundida que muestra mineralización de calcio después de cultivo en medio OS, pero no en DMEM.

FIG 21: Actividad AP de células madre mesenquimales y células madre después de 10 días de cultivo en medio OS en presencia de un sustrato de β-fosfato tricálcico.

FIG 22: Electromicrografías que muestran fibrillas de colágeno (panel A) y fibrillas de colágeno mineralizado (panel B).

FIG 23: Diagrama que muestra que la relación mineral/colágeno final del colágeno mineralizado entrecruzado estaba cerca de la relación mineral/colágeno de entrada.

FIG. 24: Sección histológica de defecto craneal 3 semanas después del implante. Puede observarse una deposición masiva de hueso en el defecto en el explante de células madre placentarias-HEALOS™.

FIGS. 25A-25C: Análisis por rayos X de los defectos craneales a las 7 semanas después del implante. FIG. 25A: la flecha indica el explante usado como control positivo BMP-2 + HEALOS™. FIG. 25B: la flecha indica explante de células madre placentarias + HEALOS™ que muestra deposición de hueso. FIG. 25C: Controles negativos HEALOS™ solo y defecto craneal sin explante.

FIG. 26: Cuantificación de la formación de hueso por densitometría. La escala en gris creciente (eje de las Y) indica densidad/deposición de hueso creciente. Eje de las X: Clase de tratamiento.

4. Descripción detallada

4.1 Células madre placentarias y poblaciones de células madre placentarias

Las células madre placentarias son células madre, que se pueden obtener de una placenta o parte de la misma, que se adhieren a un sustrato de cultivo tisular y tienen la capacidad de diferenciarse en tipos celulares no placentarios. Las células madre placentarias pueden tener un origen bien fetal o materno (esto es, pueden tener el genotipo bien de la madre o del feto). Las poblaciones de células madre placentarias, o poblaciones de células que comprenden células madre placentarias, pueden comprender células madre placentarias que tienen un origen solamente fetal o materno, o pueden comprender una población mixta de células madre placentarias tanto de origen fetal como materno. Las células madre placentarias, y poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias, pueden identificarse y seleccionarse por la característica morfológica, de marcador, y de cultivo discutida más adelante.

En un aspecto de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden células madre placentarias $CD200^+$ adherentes para uso en el tratamiento de un defecto óseo en un sujeto, en donde dicha composición se formula para ser implantable o inyectable.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan usos de una composición en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un defecto óseo en un sujeto, en donde dicha composición comprende células madre placentarias $CD200^+$ adherentes, y en donde dicha composición se formula para ser implantable o inyectable.

En determinadas realizaciones, dichas células madre placentarias adherentes son adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$. En otras realizaciones, dichas células madre placentarias adherentes han sido subcultivadas al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces.

En determinadas realizaciones, el defecto óseo es una lesión osteolítica asociada con un cáncer, una fractura ósea, o una médula espinal necesitada de fusión. En una realización particular, dicha lesión osteolítica asociada con cáncer es una lesión osteolítica asociada con mieloma múltiple, cáncer óseo, o cáncer metastásico. En otra realización particular, dicho cáncer es mieloma múltiple. En otra realización, dicho cáncer es cáncer óseo. En otra realización, dicho cáncer es cáncer metastásico.

En determinadas realizaciones, dicha composición se formula para ser inyectable en el sitio de dicho defecto óseo. En otra realización, dicha composición es inyectable y se formula para administración sistémica. En determinadas realizaciones, dicha composición comprende al menos 5×10^6 de dichas células madre placentarias por mililitro. En otra realización, dicha composición comprende un sustrato o matriz implantable.

4.1.1 Características físicas y morfológicas

Las células madre $CD34^+$ no adherentes descritas en la presente memoria, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, no se adhieren típicamente al sustrato del cultivo tisular. Las células madre no adherentes en cultivo aparecen típicamente redondeadas, similares a las células madre $CD34^+$ de la médula ósea o sangre periférica.

Las células madre placentarias adherentes para uso en la invención, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato de cultivo tisular, p. ej., superficie del contenedor de cultivo tisular (p. ej., plástico de cultivo tisular). Las células madre placentarias en cultivo asumen una apariencia generalmente fibroblastoide, estrellada, con un número de procesos citoplásmicos que se extienden desde el cuerpo celular central. Las células madre placentarias son, sin embargo, morfológicamente diferenciables de los fibroblastos cultivados bajo las mismas condiciones, ya que las células madre placentarias presentan un número mayor de dichos procesos que los fibroblastos. Morfológicamente, las células madre placentarias también son diferenciables de las células madre hematopoyéticas, que generalmente asumen una morfología más redondeada, o de empedrado, en cultivo.

4.1.2 Marcadores de la superficie celular, moleculares y genéticos

Células madre placentarias no adherentes: En un ejemplo, en la presente memoria se describe una célula madre placentaria aislada que no es adherente. En determinados ejemplos, la célula madre aislada es $CD34^+$. En determinados ejemplos, la célula madre aislada es $CD44^-$. En determinados ejemplos, la célula madre aislada es $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, la célula madre aislada es $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, la célula madre aislada es $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, la célula madre aislada es $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, la célula madre aislada es $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, la célula madre aislada se ha aislado de una placenta humana por perfusión, o por disrupción física o bioquímica de tejido placentario, p. ej., digestión enzimática. En determinados ejemplos, la célula madre aislada se ha aislado de una placenta humana por perfusión. En determinados ejemplos, la célula madre aislada facilita la formación de una matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe una población de células placentarias aisladas que no son adherentes. En determinados ejemplos, la población comprende células madre que son $CD34^+$. En determinados ejemplos, la población comprende células madre no adherentes que son $CD44^-$. En determinados ejemplos, la población comprende células madre que son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, la población comprende células madre que son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, la población comprende células madre que son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, la población comprende células madre que son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, la población comprende células madre que son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, la población comprende células madre, en donde al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, la población comprende células madre, en donde al menos aproximadamente el 90 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe una población de células madre placentarias aisladas que son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 70 % de las células madre son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 90 % de las células madre son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$.

Células madre placentarias adherentes: Las células madre placentarias adherentes para uso en la invención y las poblaciones de células madre placentarias, expresan una pluralidad de marcadores que pueden usarse para identificar y/o aislar las células madre, o poblaciones de células que comprenden las células madre. Las células madre placentarias adherentes para uso en la invención, y las poblaciones de células madre proporcionadas en la presente memoria (esto es, dos o más células madre placentarias) incluyen células madre y poblaciones de células que contienen células madre obtenidas directamente de la placenta, o cualquier parte de la misma (p. ej., amnios, corion, cotiledones placentarios, cordón umbilical, y semejantes). Las poblaciones de células madre placentarias también incluyen poblaciones de (esto es, dos o más) células madre placentarias adherentes en cultivo, y una población en un contenedor, p. ej., una bolsa. Las células madre placentarias no son, sin embargo, trofoblastos.

Las células madre placentarias adherentes descritas en la presente memoria expresan generalmente los marcadores CD73, CD105, CD200, HLA-G, y/o OCT-4, y no expresan CD34, CD38, o CD45. Las células madre placentarias también pueden expresar HLA-ABC (MHC-1) y HLA-DR. Estos marcadores pueden usarse para identificar a las células madre placentarias, y para distinguir las células madre placentarias de otros tipos de células madre. Como las células madre placentarias pueden expresar CD73 y CD105, pueden tener características semejantes a las células madre mesenquimales. Sin embargo, como las células madre placentarias pueden expresar CD200 y HLA-G, un marcador específico fetal, pueden distinguirse de las células madre mesenquimales, p. ej., células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, que no expresan CD200 ni HLA-G. De la misma manera, la ausencia de expresión de CD34, CD38 y/o CD45 identifica a las células madre placentarias como células madre no hematopoyéticas. Sin embargo, determinados subconjuntos de células madre placentarias pueden expresar, por ejemplo, CD34, y todavía ser consideradas como células madre placentarias como se proporciona en la presente memoria.

Así, en una realización, en la presente memoria se proporciona una composición para uso en la invención que comprende una célula madre placentaria adherente aislada que es $CD200^+$. En una realización específica, dicha célula madre es una célula madre placentaria. En una realización específica, la célula madre es $CD200^+$ y $HLA\text{-}G^+$. En una realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha célula madre $CD200^+$ facilita la formación de cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende las células madre, bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria también se proporciona un método para seleccionar una célula madre placentaria para uso en la invención a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una célula placentaria CD200, mediante lo cual dicha célula es una célula madre placentaria. En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es tanto $CD200^+$ como $HLA\text{-}G^+$. En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es $CD34^-$, $CD38^-$ o $CD45^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ y $CD105^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también facilita la formación de cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende las células madre, bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una población aislada de células que comprende células madre placentarias $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$ adherentes aisladas para uso en la invención. En una realización específica, dicha población es una población de células placentarias. En otra realización específica, la población es una población células madre placentarias $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$ adherentes aisladas. En varias realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 % de dichas células son células madre $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$. Preferiblemente, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son células madre $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$. Más preferiblemente, al menos aproximadamente el 90 %, 95 %, o 99 % de dichas células son células madre $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$. En una realización específica de las poblaciones aisladas, dichas células madre también son $CD73^+$

y CD105$^+$. En otra realización específica, dichas células madre también son CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En una realización más específica, dichas células madre también son CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, CD73$^+$ y CD105$^+$. En otra realización, dicha población aislada produce uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para seleccionar una población de células madre placentarias para uso en la invención a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una población de células placentarias en donde al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de dichas células son células madre CD200$^+$, HLA-G$^+$. En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre que también son CD73$^+$ y CD105$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre que también son CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre que también son CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, CD73$^+$ y CD105$^+$. En otra realización específica, dicha selección también comprende seleccionar una población de células madre placentarias que forma uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición para uso en la invención que comprende una célula madre aislada que es CD73$^+$, CD105$^+$, y CD200$^+$. En una realización específica, dicha célula madre aislada es una célula madre placentaria adherente aislada. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En una realización más específica, dicha célula madre es adicionalmente CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, y HLA-G$^+$. En otra realización específica, la célula madre CD73$^+$, CD105$^+$, y CD200$^+$ aislada facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende la célula madre, cuando la población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para seleccionar una célula madre placentaria adherente para uso en la invención a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una célula placentaria CD73$^+$, CD105$^+$, y CD200$^+$, mediante lo cual dicha célula es una célula madre placentaria. En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, y HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende adicionalmente seleccionar una célula madre CD73$^+$, CD105$^+$, y CD200$^+$ que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende la célula madre, cuando la población se cultiva bajo condiciones que facilitan la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, la composición para uso en la invención puede comprender una población aislada de células que comprende células madre placentarias adherentes CD73$^+$, CD105$^+$, CD200$^+$. En un ejemplo específico, dichas células madre son células madre placentarias. En otra realización específica, la población es una población de células madre placentarias CD73$^+$, CD105$^+$, CD200$^+$ aisladas. En varias realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 % de dichas células son células madre placentarias CD73$^+$, CD105$^+$, CD200$^+$. En otra realización, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células en dicha población de células son células madre placentarias CD73$^+$, CD105$^+$, CD200$^+$. En otra realización, al menos aproximadamente el 90 %, 95 % o 99 % de dichas células en dicha población de células son células madre placentarias CD73$^+$, CD105$^+$, CD200$^+$. En una realización específica de dichas poblaciones, dichas células madre también son HLA-G$^+$. En otra realización específica, dichas células madre son CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dichas células madre son CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En una realización más específica, dichas células madre son CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, y HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha población de células produce uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para seleccionar una célula madre placentaria para uso en la invención a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una población de células placentarias en donde al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de dichas células son células madre CD73$^+$, CD105$^+$,

CD200$^+$. En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre que también son HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre que también son CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre que también son CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre que también son CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, y HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende adicionalmente seleccionar una población de células placentarias que produce uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando la población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En la presente memoria también se proporciona una composición para uso en la invención que comprende una célula madre placentaria adherente que es CD200$^+$ y OCT-4$^+$. En una realización específica, la célula madre es adicionalmente CD73$^+$ y CD105$^+$. En una realización específica, la célula madre es una célula madre placentaria. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En una realización más específica, dicha célula madre es adicionalmente CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$. En otra realización específica, la célula madre facilita la producción de uno o más cuerpos semejantes a embrioides por una población de células placentarias que comprende la célula madre, cuando la población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para seleccionar una célula madre placentaria para uso en la invención a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una célula placentaria CD200$^+$ y OCT-4$^+$, mediante lo cual dicha célula es una célula madre placentaria. En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también es CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula madre placentaria que también facilita la producción de uno o más cuerpos semejantes a embrioides por una población de células placentarias que comprende la célula madre, cuando la población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

La composición para uso en la invención puede comprender una población aislada de células que comprende células madre placentarias adherentes CD200$^+$, OCT-4$^+$ para uso en la invención. Dichas células madre son células madre placentarias. En otra realización específica, dicha población es una población de células madre placentarias adherentes CD200$^+$, OCT-4$^+$. En varias realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 % de dichas células son células madre CD200$^+$, OCT-4$^+$. En otra realización, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son dichas células madre CD200$^+$, OCT-4$^+$. En otra realización, al menos aproximadamente el 90 %, 95 %, o 99 % de dichas células son dichas células madre CD200$^+$, OCT-4$^+$. En una realización específica de las poblaciones aisladas, dichas células madre son también CD73$^+$ y CD105$^+$. En otra realización específica, dichas células madre también son HLA-G$^+$. En otra realización específica, dichas células madre también son CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En una realización más específica, dichas células madre también son CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha población produce uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para seleccionar una población de células madre placentarias para uso en la invención a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una población de células placentarias en donde al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de dichas células son células madre placentarias adherentes CD200$^+$, OCT-4$^+$. En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre placentarias que también son CD73$^+$ y CD105$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre placentarias que también son HLA-G$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre placentarias que también son CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otra realización específica, dichas células madre también son CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$.

En la presente memoria se proporciona además una composición para uso en la invención que comprende células madre placentarias adherentes que son CD200$^+$, CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$. En una realización específica, la célula madre es una célula madre placentaria. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente CD34$^-$,

CD38$^-$ o CD45$^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otra realización específica, dicha célula madre es adicionalmente OCT-4$^+$. En otra realización específica, dicha célula madre es CD200$^+$. En una realización más específica, dicha célula madre es CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, OCT-4$^+$ y CD200$^+$. En otra realización específica, dicha célula madre facilita la formación de cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre, cuando la población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En otra realización, en la presente memoria también se proporciona un método para seleccionar una célula madre placentaria para uso en la invención a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una célula placentaria adherente CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$, mediante lo cual dicha célula es una célula madre placentaria. En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula madre placentaria que también es CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula madre placentaria que también es CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula madre placentaria que también es OCT-4$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula madre placentaria que es CD200$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula madre placentaria que también es CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, OCT-4$^+$ y CD200$^+$. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre, cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides.

En la presente memoria también se describe una población aislada de células que comprende células madre CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$. En un ejemplo específico, dichas células madre son células madre placentarias. En otro ejemplo, dicha población es una población de células madre CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$. En varios ejemplos, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 % de dichas células son células madre CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$. En otro ejemplo, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$. En otro ejemplo, al menos aproximadamente el 90 %, 95 % o 99 % de dichas células son células madre CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$. En un ejemplo específico de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dichas células madre son CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dichas células madre son OCT-4$^+$. En otra realización específica, dichas células madre placentarias adherentes para uso en la invención son CD200$^+$. En una realización más específica, dichas células madre son CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, OCT-4$^+$ y CD200$^+$. En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para seleccionar una población de células madre placentarias a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una población de células placentarias en donde una mayoría de dichas células son CD73$^+$, CD105$^+$ y HLA-G$^+$. En un ejemplo específico, dicha mayoría de células también son CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dicha mayoría de células también son CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otra realización específica, dicha mayoría de células son CD200$^+$. En otra realización específica, dicha mayoría de células también son CD34$^-$, CD38$^-$, CD45$^-$, OCT-4$^+$ y CD200$^+$.

En otro ejemplo, en la presente memoria se describe una célula madre aislada que es CD73$^+$ y CD105$^+$ y que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En un ejemplo específico, dicha célula madre es CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dicha célula madre es CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dicha célula madre es OCT4$^+$. En un ejemplo más específico, dicha célula madre es OCT4$^+$, CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$.

En la presente memoria se describe además una población de células placentarias aisladas que comprende células madre CD73$^+$, CD105$^+$, en donde dicha población forma uno o más cuerpos semejantes a embrioides bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En un ejemplo específico, dicha célula madre es una célula madre placentaria. En otro ejemplo específico, dicha población es una población de células madre placentarias que son células madre CD73$^+$, CD105$^+$, en donde dicha población forma uno o más cuerpos semejantes a embrioides bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En varios ejemplos, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de dichas células placentarias aisladas son células madre CD73$^+$, CD105$^+$. En un ejemplo específico de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD34$^-$, CD38$^-$ o CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dichas células madre son CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dichas células madre son OCT-4$^+$. En un ejemplo más específico, dichas células madre son OCT-4$^+$, CD34$^-$, CD38$^-$ y CD45$^-$. En otros ejemplos específicos, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, ha sido subcultivada al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces.

En la presente memoria se describe además una célula madre aislada que es OCT-4$^+$ y que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En un ejemplo específico, dicha célula madre es CD73$^+$ y CD105$^+$. En otro ejemplo específico, dicha célula madre es CD34$^-$, CD38$^-$, o CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dicha célula madre es CD200$^+$. En un ejemplo más específico, dicha célula madre es CD73$^+$, CD105$^+$, CD200$^+$, CD34$^-$, CD38$^-$, y CD45$^-$.

En la presente memoria también se describe una población de células placentarias aisladas que comprende células madre OCT-4$^+$, en donde dicha población forma uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En un ejemplo específico, las células madre son células madre placentarias. En otro ejemplo específico, dicha población es una población de células madre placentarias que son células madre OCT-4$^+$, en donde dicha población forma uno o más cuerpos semejantes a embrioides cuando se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides. En varios ejemplos, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 % al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de dichas células placentarias aisladas son células madre OCT4$^+$. En un ejemplo específico de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD73$^+$ y CD105$^+$. En otro ejemplo específico, dichas células madre son CD34$^-$, CD38$^-$, o CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dichas células madre son CD200$^+$. En un ejemplo más específico, dichas células madre son CD73$^+$, CD105$^+$, CD200$^+$, CD34$^-$, CD38$^-$, y CD45$^-$. En otro ejemplo específico, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, subcultivada al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces.

En la presente memoria se proporcionan además células madre placentarias para uso en la invención que se obtienen por digestión enzimática (véase la Sección 5.2.3) o perfusión (véase la Sección 5.2.4). Por ejemplo, en la presente memoria se proporciona una población aislada de células madre placentarias para uso en la invención que se produce según un método que comprende perfundir una placenta de mamífero que ha sido drenada de sangre del cordón y perfundida para eliminar la sangre residual; perfundir dicha placenta con una disolución de perfusión; y recoger dicha disolución de perfusión, en donde dicha disolución de perfusión después de la perfusión comprende una población de células placentarias que comprende células madre placentarias; y aislar una pluralidad de dichas células madre placentarias de dicha población de células. En una realización específica, la disolución de perfusión se pasa a través tanto de la vena umbilical como de las arterias umbilicales y se recoge después de que exuda de la placenta. Las poblaciones de células madre placentarias producidas por este método comprenden típicamente una mezcla de células fetales y maternas. En otra realización específica, la disolución de perfusión se pasa a través de la vena umbilical y se recoge de las arterias umbilicales, o se pasa a través de las arterias umbilicales y se recoge de la vena umbilical. Las poblaciones de células madre placentarias producidas por este método típicamente tienen un origen sustancialmente exclusivamente fetal; esto es, p. ej., más del 90 %, 95 %, 99 %, o 99.5 % de las células madre placentarias en la población tienen un origen fetal.

En varias realizaciones, las células madre placentarias para uso en la invención, contenidas en una población de células obtenida a partir de la perfusión de una placenta, son al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o al menos el 99.5 % de dicha población de las células placentarias. En otra realización específica, dichas células madre placentarias recogidas por perfusión comprenden células fetales y maternas. En otra realización específica, dichas células madre placentarias recogidas por perfusión son al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o al menos el 99.5 % células fetales.

En otra realización específica, en la presente memoria se proporciona una composición para uso en la invención que comprende células madre placentarias adherentes CD200$^+$ recogidas por perfusión, en donde dicha composición comprende al menos una parte de la disolución de perfusión usada para recoger las células madre placentarias.

La composición para uso en la invención puede comprender una población aislada de las células madre placentarias para uso en la invención que se produce según un método que comprende digerir tejido placentario con una enzima disruptora de tejido para obtener una población de células placentarias que comprende células madre placentarias, y aislar una pluralidad de células madre placentarias del resto de dichas células placentarias. El total, o cualquier parte de, la placenta puede digerirse para obtener células madre placentarias. En realizaciones específicas, por ejemplo, dicho tejido placentario es una placenta completa, una membrana amniótica, corion, una combinación de amnios y corion, o una combinación de cualquiera de los anteriores. En otra realización específica, la enzima disruptora de tejido es tripsina o colagenasa. En varias realizaciones, las células madre placentarias, contenidas en una población de células obtenida de la digestión de una placenta, son al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o al menos el 99.5 % de dicha población de células placentarias.

El perfilado genético confirma que las células madre placentarias adherentes aisladas, y las poblaciones de células madre placentarias aisladas, se pueden distinguir de otras células, p. ej., células madre mesenquimales, p. ej., células

madre derivadas de la médula ósea. Las células madre placentarias adherentes descritas en la presente memoria, pueden distinguirse de las células madre mesenquimales sobre la base de la expresión de uno o más genes, cuya expresión es específica de las células madre placentarias o células madre del cordón umbilical en comparación con células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. En particular, las células madre placentarias adherentes pueden distinguirse de las células madre mesenquimales sobre la base de la expresión de uno o más genes, cuya expresión es significativamente mayor (esto es, al menos dos veces mayor) en células madre placentarias que en células madre mesenquimales, en donde el uno o más gene(s) (son) ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ATRS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A, o una combinación de cualquiera de los anteriores, en donde la expresión de estos genes es mayor en células madre placentarias o células madre del cordón umbilical que en células madre derivadas de la médula ósea, cuando las células madre se crecen en condiciones equivalentes. En una realización específica, el gen específico de la célula madre placentaria o específico de la célula madre del cordón umbilical es CD200.

El nivel de expresión de estos genes puede usarse para confirmar la identidad de una población de células placentarias, para identificar una población de células como que comprende al menos una pluralidad de células madre placentarias, o semejantes. La población de las células madre placentarias, cuya identidad se confirma, puede ser clonal, p. ej., una población de células madre placentarias expandidas a partir de una única célula madre placentaria, o una población mixta de las células madre, p. ej., una población de células que comprende solamente células madre placentarias que se expanden a partir de múltiples células madre placentarias, o una población de células que comprende células madre placentarias y al menos otro tipo de célula.

El nivel de expresión de estos genes puede usarse para seleccionar poblaciones de células madre placentarias adherentes. Por ejemplo, una población de células, p. ej., células expandidas clonalmente, se selecciona si la expresión de uno o más de estos genes es significativamente mayor en una muestra de la población de las células que en una población equivalente de células madre mesenquimales. Dicha selección puede ser de una población de una pluralidad de poblaciones de células madre placentarias, de una pluralidad de poblaciones de células, cuya identidad no se conoce, etc.

Las células madre placentarias adherentes pueden seleccionarse sobre la base del nivel de expresión de uno o más de dichos genes comparado con el nivel de expresión de dicho uno o más genes en una célula madre mesenquimal control. En una realización, el nivel de expresión de dicho uno o más genes en una muestra que comprende un número equivalente de células madre mesenquimales se usa como un control. En otra realización, el control, para las células madre placentarias ensayadas bajo determinadas condiciones, es un valor numérico que representa el nivel de expresión de dicho uno o más genes en células madre mesenquimales bajo dichas condiciones.

Las poblaciones aisladas de células madre placentarias adherentes o no adherentes descritas anteriormente, y las poblaciones de células madre placentarias generalmente, pueden comprender aproximadamente, al menos, o no más de, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} o más células madre placentarias.

4.1.3 Crecimiento en cultivo

El crecimiento de las células madre placentarias descritas en la presente memoria, como para cualquier célula de mamífero, depende, en parte, del medio particular seleccionado para el crecimiento. Bajo condiciones óptimas, las células madre placentarias típicamente 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 contenedor de cultivo tisular (p. ej., plástico de la placa de cultivo tisular, plástico recubierto con fibronectina, y semejantes) y forman una monocapa.

Las poblaciones de células placentarias adherentes aisladas que comprenden las células madre placentarias para uso en la invención, cuando se cultivan bajo condiciones apropiadas, forman cuerpos semejantes a embrioides, esto es, agrupaciones tridimensionales de células que crecen por encima de la capa de células célula madre adherentes. Las células en los cuerpos semejantes a embrioides expresan marcadores asociados con células madre muy tempranas, p. ej., OCT-4, Nanog, SSEA3 y SSEA4. Las células en los cuerpos semejantes a embrioides típicamente no son adherentes al sustrato de cultivo, como lo son las células madre placentarias descritas en la presente memoria, pero permanecen unidas a las células adherentes durante el cultivo. Las células de los cuerpos semejantes a embrioides dependen de las células madre placentarias adherentes para su viabilidad, ya que los cuerpos semejantes a embrioides no se forman en ausencia de las células madre adherentes. Las células madre placentarias adherentes facilitan así el crecimiento de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende las células madre placentarias adherentes. Sin pretender la vinculación por teoría, se piensa que las células de los cuerpos semejantes a embrioides crecen sobre las células madre placentarias adherentes como las

células madre embrionarias crecen sobre una capa de alimentación de células. Las células madre mesenquimales, p. ej., células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, no desarrollan cuerpos semejantes a embrioides en cultivo.

4.2 Métodos para obtener células madre placentarias

4.2.1 Composición para la recogida de las células madre

En la presente memoria se proporcionan además métodos para recoger y aislar células madre placentarias para uso en la invención. Generalmente, las células madre se obtienen a partir de una placenta de mamífero usando una disolución fisiológicamente aceptable, p. ej., una composición para la recogida de células madre. Una composición para la recogida de células madre se describe con detalle en la Solicitud Provisional U.S. relacionada No. 60/754 969, titulada "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs", presentada el 29 de diciembre, 2005.

La composición para la recogida de células madre puede comprender cualquier disolución fisiológicamente aceptable adecuada para la recogida y/o cultivo de las células madre, por ejemplo, una disolución salina (p. ej., disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Kreb, disolución de Kreb modificada, disolución de Eagle, NaCl al 0.9 %. etc.), un medo de cultivo (p. ej., DMEM, H.DMEM, etc.), y semejantes.

La composición para la recogida de células madre puede comprender uno o más componentes que tienden a preservar las células madre placentarias, esto es, previenen que las células madre placentarias se sequen, o retrasan la muerte de las células madre placentarias, reducen el número de las células madre placentarias en una población de células que mueren, o semejantes, desde el momento de la recogida hasta el momento del cultivo. Dichos 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 de magnesio, un fármaco antihipertensor, péptido atrial natriurético (ANP), adrenocorticotropina, hormona de liberación de corticotropina, nitroprúsido de sodio, hidralazina, adenosina trifosfato, adenosina, sulfato de indometacina o magnesio, 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-α; y/o un perfluorocarbono transportador de oxígeno (p. ej., bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

La composición para la recogida de células madre puede comprender una o más enzimas degradantes de tejido, p. ej., una metaloproteasa, una proteasa de serina, una proteasa neutra, una ARNasa, o una ADNasa, o semejantes. Dichas enzimas incluyen, pero no están limitadas a, colagenasas (p. ej., colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASA, hialuronidasa, y semejantes.

La composición para la recogida de células madre puede comprender una cantidad bacteriocídicamente o bacteriostáticamente efectiva de un antibiótico. En determinadas realizaciones no limitantes, el antibiótico es un macrólido (p. ej., tobramicina), una cefalosporina (p. ej., cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxil), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (p. ej., penicilina V) o una quinolona (p. ej., ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomicina, etc. En una realización particular, el antibiótico es activo frente a bacterias Gram($^+$) y/o Gram(-), p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y semejantes.

La composición para la recogida de células madre también puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM); iones magnesio (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); una macromolécula con un 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 natural o sintético, un polisacárido tal como dextrano o un polietilen glicol presente a aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (p. ej., hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presente a aproximadamente 25 μM a aproximadamente 100 μM); un agente reductor (p. ej., N-acetilcisteína presente a aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que previene la entrada de calcio en las células (p. ej., verapamil presente a aproximadamente 2 μM a aproximadamente 25 μM); nitroglicerina (p. ej., aproximadamente 0.05 g/L a aproximadamente 0.2 g/L); un anticoagulante, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de la sangre residual (p. ej., heparina o hirudina presente a una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100 000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (p. ej., amilorida, etil isopropil amilorida, hexametilen amilorida, dimetil amilorida o isobutil amilorida presente a aproximadamente 1.0 μM a aproximadamente 5 μM).

4.2.2 Recogida y manejo de la placenta

Generalmente, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento. Preferiblemente, la placenta se recupera de un paciente después de obtener el consentimiento informado y después de obtener un historial médico completo del paciente y está asociado con la placenta. Preferiblemente, el historial

médico continúa después del parto. Dicho historial médico puede usarse para coordinar el uso posterior de la placenta o las células madre recogidas a partir de la misma. Por ejemplo, las células madre placentarias humanas pueden usarse, a la vista del historial médico, para medicina personalizada del recién nacido asociado con la placenta, o para los padres, hermanos u otros familiares del recién nacido.

Antes de la recuperación de las células madre placentarias, se eliminan la sangre del cordón umbilical y la sangre placentaria. En determinados casos, después del parto, se recupera la sangre del cordón en la placenta. La placenta puede someterse a un proceso convencional de recuperación de la sangre del cordón. Típicamente, se usa una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para desangrar la placenta (véase, p. ej., Anderson, Patente U.S. No. 5 372 581; Hessel *et al*, Patente U.S. No. 5 415 665). La aguja o cánula se pone habitualmente en la vena umbilical y la placenta puede masajearse suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón de la placenta. Dicha recuperación de la sangre del cordón puede realizarse comercialmente, p. ej., LifeBank USA, Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell. Preferiblemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional, de manera que se minimiza la disrupción del tejido durante la recuperación de la sangre del cordón.

Típicamente, una placenta se transporta desde la habitación de parto o nacimiento a otra localización, p. ej., un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y recogida de las células madre, p. ej., por perfusión o disociación de tejidos. La placenta se transporta preferiblemente en un dispositivo de transporte estéril con aislamiento térmico (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28 °C), por ejemplo, poniendo la placenta, con el cordón umbilical proximal pinzado, en una bolsa de plástico con cierre de zip, que se pone entonces en un contenedor térmicamente aislado. En otro ejemplo, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre del cordón sustancialmente como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos en tramitación no. 11/230 760, presentada el 19 de septiembre, 2005. Preferiblemente, la placenta llega al laboratorio cuatro a veinticuatro horas después del parto. En determinados ejemplos, el cordón umbilical proximal se pinza, preferiblemente en 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco de la placenta antes de la recuperación de la sangre del cordón. En otros ejemplos, el cordón umbilical proximal se pinza después de la recuperación de la sangre del cordón, pero antes del procesamiento adicional de la placenta.

La placenta, antes de la recogida de las células madre, puede almacenarse en condiciones estériles y bien a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25 ºC (centígrados). La placenta puede almacenarse 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 del cordón residual. La placenta se almacena preferiblemente en una disolución anticoagulante a una temperatura de 5 a 25 ºC (centígrados). Las disoluciones de anticoagulante adecuadas son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede usarse una disolución de heparina o warfarina de sodio. En un ejemplo preferido, la disolución de anticoagulante comprende una disolución de heparina (p. ej., 1 % p/p en una disolución 1:1000). La placenta desangrada se almacena preferiblemente durante no más de 36 horas antes de recoger las células madre placentarias.

La placenta de mamífero o una parte de la misma, una vez recogida y preparada generalmente como anteriormente, puede tratarse de cualquier manera conocida en la técnica, p. ej., puede perfundirse o disrumpirse, p. ej., digerirse con una o más enzimas disruptoras de tejido, para obtener células madre.

4.2.3 Disrupción física y digestión enzimática del tejido placentario

En una realización, las células madre placentarias para uso en la invención se recogen de una placenta de mamífero por disrupción física, p. ej., digestión enzimática, del órgano. Por ejemplo, la placenta, o una parte de la misma, puede, p. ej., triturarse, recortarse, molerse, trocearse, picarse, macerarse o semejantes, mientras está en contacto con la composición para la recogida de las células madre proporcionada en la presente memoria, y el tejido puede digerirse posteriormente con una o más enzimas. La placenta, o una parte de la misma, también puede disrumpirse físicamente y digerirse con una o más enzimas, y el material resultante sumergirse en, o mezclarse con, la composición para la recogida de las células madre. Puede usarse cualquier método de disrupción física, siempre que el método de disrupción deje una pluralidad, más preferiblemente una mayoría, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % de las células en dicho órgano viables, según se determina, p. ej., por exclusión de azul de tripán.

La placenta puede diseccionarse en componentes antes de la disrupción física y/o digestión enzimática y la recuperación de las células madre. Por ejemplo, las células madre placentarias pueden obtenerse a partir de la membrana amniótica, corion, cordón umbilical, cotiledones placentarios, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, las células madre placentarias se obtienen a partir de tejido placentario que comprende amnios y corion. Típicamente, las células madre placentarias pueden obtenerse por disrupción de un pequeño bloque de tejido placentario, p. ej., un bloque de tejido placentario que tiene un volumen de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o aproximadamente 1000 milímetros cúbicos.

Una composición para la recogida de células madre preferida comprende una o más enzimas disruptoras de tejido. La digestión enzimática usa preferiblemente una combinación de enzimas, p. ej., una combinación de una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra, por ejemplo, una combinación de colagenasa y dispasa. En una realización, la digestión enzimática del tejido placentario usa una combinación de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra, y una enzima mucolítica para la digestión de ácido hialurónico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa, y hialuronidasa o una combinación de LIBERASA (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.) y hialuronidasa. Otras enzimas que pueden usarse para disrumpir el tejido placentario incluyen papaína, desoxirribonucleasas, proteasas de serina, tales como tripsina, quimiotripsina, o elastasa. Las proteasas de serina pueden inhibirse por alfa 2 microglobulina en suero y, por lo tanto, el medio usado para la digestión carece habitualmente de suero. Comúnmente, se usan EDTA y ADNasa en los procedimientos de digestión enzimática para incrementar la eficiencia de la recuperación celular. El digerido se diluye preferiblemente de manera que se evita el atrapamiento de células madre en el digerido viscoso.

Puede usarse cualquier combinación de enzimas para la digestión de tejidos. Las concentraciones típicas para las enzimas para la digestión de tejidos incluyen, p. ej., 50-200 U/mL para colagenasa I y colagenasa IV, 1-10 U/mL para dispasa, y 10-100 U/mL para elastasa. Pueden usarse proteasas en combinación, esto es, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o pueden usarse secuencialmente con el fin de liberar las células madre placentarias. Por ejemplo, una placenta, o parte de la misma, se digiere en primer lugar con una cantidad apropiada de colagenasa I a 2 mg/ml durante 30 minutos, seguido de digestión con tripsina, al 0.25 %, durante 10 minutos, a 37 ºC. Las proteasas de serina se usan preferiblemente consecutivamente después del uso de otras enzimas.

En otra realización, el tejido puede disrumpirse además por la adición de un quelante, p. ej., ácido etilen glicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N'N'-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la composición para la recogida de células madre que comprende las células madre, o a una disolución en la que se disrumpe y/o digiere el tejido antes del aislamiento de las células madre con la composición para la recogida de células madre.

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

4.2.4 Perfusión placentaria

Las células madre placentarias para uso en la invención también pueden obtenerse por perfusión de la placenta de mamífero. Los métodos para perfundir placenta de mamífero para obtener células madre se describen, p. ej., en Hariri, Publicación de Solicitud U.S. No. 2002/0123141, y en la Solicitud Provisional U.S. No. 60/754 969 relacionada, titulada "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs", presentada el 29 de diciembre, 2005.

Las células madre placentarias pueden recogerse por perfusión, p. ej., a través de la vasculatura placentaria, usando, p. ej., una composición para la recogida de células madre como una disolución de perfusión. En una realización, una placenta de mamífero se perfunde por el paso de la disolución de perfusión a través de cualquiera de o ambas de la arteria umbilical y vena umbilical. El flujo de la disolución de perfusión a través de la placenta puede conseguirse usando, p. ej., flujo de gravedad en la placenta. Preferiblemente, la disolución de perfusión se fuerza a través de la placenta usando una bomba, p. ej., una bomba peristáltica. La vena umbilical puede, p. ej., canularse con una cánula, p. ej., una cánula de TEFLON® o plástico, que está conectada a un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión.

En la preparación para la perfusión, la placenta se orienta preferiblemente {p. ej., se suspende) de una manera tal que la arteria umbilical y la vena umbilical están localizadas en el punto más alto de la placenta. La placenta puede perfundirse por el paso de un fluido de perfusión a través de la vasculatura placentaria y tejido circundante. La placenta también puede perfundirse por el paso de un fluido de perfusión en la vena umbilical y recogida de las arterias umbilicales, o por el paso de un fluido de perfusión en las arterias umbilicales y recogida de la vena umbilical.

En una realización, por ejemplo, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente, p. ej., a una pipeta que está conectada mediante un conector flexible a un reservorio de la disolución de perfusión. La disolución de perfusión se pasa en la vena y arteria umbilical. La disolución de perfusión exuda de y/o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos en los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un recipiente abierto adecuado desde la superficie de la placenta que estaba unida al útero de la madre durante la gestación. La disolución de perfusión también puede introducirse a través de la apertura del cordón umbilical y dejar que fluya o percole fuera de las aperturas en la pared de la placenta que están en interfase con la pared uterina materna. Las células

placentarias que se recogen por este método, que puede referirse como un método "general", son típicamente una mezcla de células fetales y maternas.

En otra realización, la disolución de perfusión se pasa a través de las venas umbilicales y se recoge de la arteria umbilical, o se pasa a través de la arteria umbilical y se recoge de las venas umbilicales. Las células placentarias recogidas por este método, que puede referirse como un método de "circuito cerrado", son típicamente casi exclusivamente fetales.

Se apreciará que la perfusión usando el método general, esto es, mediante el cual el perfusado se recoge después de que haya exudado del lado materno de la placenta, produce una mezcla de células fetales y maternas. Como resultado, las células recogidas por este método comprenden una población mixta de células madre placentarias tanto de origen fetal como materno. Por el contrario, la perfusión solamente a través de la vasculatura placentaria en el método del circuito cerrado, mediante el cual el fluido de perfusión se pasa a través de uno o dos vasos placentarios y se recoge solamente a través del o de los vasos remanentes. produce la recogida de una población de células madre placentarias casi exclusivamente de origen fetal.

El método de perfusión de circuito cerrado puede, en una realización, realizarse como sigue. Se obtiene una placenta postparto en aproximadamente 48 horas después del nacimiento. El cordón umbilical se pinza y se corta por encima del pinzamiento. El cordón umbilical puede desecharse, o puede procesarse para recuperar, p. ej., células madre del cordón umbilical, y/o para procesar la membrana del cordón umbilical para la producción de un biomaterial. La membrana amniótica puede retenerse durante la perfusión, o puede separarse del corion, p. ej., usando una disección roma con los dedos. Si la membrana amniótica se separa del corion antes de la perfusión, puede, p. ej., desecharse, o procesarse, p. ej., para obtener células madre por digestión enzimática, o para producir, p. ej., un biomaterial de membrana amniótica, p. ej., el biomaterial descrito en la Publicación de la Solicitud U.S. No. 2004/0048796. Después de limpiar la placenta de todos los coágulos de sangre visibles y de sangre residual, p. ej., usando una gasa estéril, los vasos del cordón umbilical se exponen, p. ej., cortando parcialmente la membrana del cordón umbilical para exponer una sección transversal del cordón. Los vasos se identifican, y se abren, p. ej., haciendo avanzar una pinza de cocodrilo cerrada a través del extremo cortado de cada vaso. El aparato, p. ej., tubo de plástico conectado a un dispositivo de perfusión o bomba peristáltica, se inserta entonces en cada una de las arterias placentarias. La bomba puede ser cualquier bomba adecuada para el propósito, p. ej., una bomba peristáltica. Los tubos de plástico, conectados a un reservorio de recogida estéril, p. ej., una bolsa de sangre tal como una bolsa de recogida de 250 mL, se insertan entonces en la vena placentaria. Alternativamente, los tubos conectados a la bomba se insertan en la vena placentaria, y los tubos a un o unos reservorios de recogida se insertan en una o ambas de las arterias placentarias. La placenta se perfunde entonces con un volumen de disolución de perfusión, p. ej., aproximadamente 750 ml de disolución de perfusión. Las células en el perfusado se recogen entonces, p. ej., por centrifugación.

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

La primera recogida del fluido de perfusión de una placenta de mamífero durante el proceso de desangrado está generalmente coloreada con células sanguíneas rojas residuales de la sangre del cordón y/o sangre de la placenta. El fluido de perfusión se vuelve más incoloro al continuar la perfusión y las células sanguíneas del cordón residuales se eliminan por lavado de la placenta. Generalmente, de 30 a 100 ml (mililitros) de fluido de perfusión son adecuados para desangrar inicialmente la placenta, pero puede usarse más o menos fluido de perfusión dependiendo de los resultados observados.

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

La placenta puede perfundirse una pluralidad de veces durante el curso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se va a perfundir una pluralidad de veces, puede mantenerse o cultivarse en condiciones asépticas en un contenedor u otro recipiente adecuado, y perfundirse con la composición para la recogida de células madre, o una disolución de perfusión estándar (p. ej., una disolución salina normal tal como disolución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (p. ej., heparina, warfarina de sodio, cumarina, bishidroxicumarina), y/o con o sin un agente antimicrobiano (p. ej, β-mercaptoetanol (0.1 mM); antibióticos tales como estreptomicina (p. ej., a 40-100 µg/ml), penicilina (p. ej., a 40U/ml), anfotericina B (p. ej., a 0.5 µg/ml). En una realización, una placenta aislada se mantiene o cultiva durante un periodo de tiempo sin recoger el perfusado, de manera que la placenta se mantiene o 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 perfusado. La placenta perfundida puede mantenerse durante uno o más tiempos adicionales, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más horas,

y perfundirse un segunda vez con, p. ej., 700-800 mL de fluido de perfusión. La placenta puede perfundirse 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., composición para la recogida de células madre, se repite hasta que el número de células nucleadas recogidas se encuentra por debajo de 100 células/ml. Los perfusados a diferentes puntos de tiempo pueden procesarse adicionalmente individualmente para recuperar poblaciones de células dependientes del tiempo, p. ej., células madre. También pueden combinarse perfusados de diferentes puntos de tiempo.

Sin pretender la vinculación por ninguna teoría, después del desangrado y un tiempo suficiente de perfusión de la placenta, se cree que las células madre placentarias migran en la microcirculación desangrada y perfundida de la placenta donde se recogen, preferiblemente mediante lavado en un recipiente de recogida por perfusión. La perfusión de la placenta aislada no solo sirve para eliminar sangre del cordón residual sino también para proporcionar a la placenta nutrientes apropiados, incluyendo oxígeno. La placenta puede cultivarse y perfundirse con una disolución similar a la que se usó para eliminar las células sanguíneas del cordón residuales, preferiblemente, sin la adición de agentes anticoagulantes.

La perfusión según los métodos proporcionados en la presente memoria produce la recogida de significativamente más células madre placentarias que el número que se puede obtener a partir de una placenta de mamífero no perfundida con dicha disolución, y no tratada de otra forma para obtener células madre (p. ej., por disrupción de tejido, p. ej., digestión enzimática). En este contexto, "significativamente más" significa al menos aproximadamente un 10 % más. La perfusión rinde significativamente más células madre placentarias que, p. ej., el número de células madre placentarias que se puede obtener a partir del medio de cultivo en el que una placenta, o parte de la misma, se ha cultivado.

Las células madre pueden aislarse de la placenta por perfusión con una disolución que comprende una o más proteasas u otras enzimas disruptoras de tejido. En una realización específica, una placenta o parte de la misma (p. ej., membrana amniótica, amnios y corion, lóbulo o cotiledón placentario, cordón umbilical, o combinación de cualquiera de los anteriores) se lleva a 25-37 ºC, y se incuba con una o más enzimas disruptoras de tejido en 200 mL de un medio de cultivo durante 30 minutos. Las células del perfusado se recogen, se llevan a 4 ºC, y se lavan con una mezcla de inhibidores fría que comprende EDTA 5 mM, ditiotreitol 2 mM y beta-mercaptoetanol 2 mM. Las células madre se lavan después de varios minutos con una composición para la recogida de células madre fría (p. ej., 4 ºC) proporcionada en la presente memoria.

4.2.5 Perfusado placentario y células de perfusado placentario

El perfusado placentario, y las células de perfusado placentario, p. ej., células nucleadas totales aisladas de perfusado placentario, comprenden una colección heterogénea de células. Típicamente, el perfusado placentario, y las células de perfusado placentario, se deplecionan de eritrocitos antes de su uso. Dicha depleción puede llevarse a cabo por métodos conocidos de separación de las células sanguíneas rojas de las células sanguíneas nucleadas. En determinados casos, el perfusado placentario o las células del perfusado de criopreservan. En determinados otros casos, el perfusado placentario comprende, o las células del perfusado comprenden, solo células fetales, o una combinación de células fetales y células maternas.

Típicamente, el perfusado placentario de una única perfusión placentaria comprende aproximadamente 100 millones a aproximadamente 500 millones de células nucleadas. En determinados ejemplos, el perfusado placentario o las células del perfusado comprenden células $CD34^+$, p. ej., células madre o progenitoras hematopoyéticas. Dichas células pueden comprender células madre o progenitoras $CD34^+CD45^-$, células madre o progenitoras $CD34^+CD45^+$, progenitores mieloides, progenitores linfoides, y/o progenitores eritroides. En otros ejemplos, el perfusado placentario y las células de perfusado placentario comprenden células madre placentarias adherentes, p. ej., células madre $CD34^-$, p. ej., células madre placentarias adherentes como se describe en la Sección 5.1, anteriormente. En otros ejemplos, el perfusado placentario y las células de perfusado placentario comprenden, p. ej., células progenitoras endoteliales, células osteoprogenitoras, y células asesinas naturales. En determinados casos, el perfusado placentario según se recoge de la placenta y deplecionado de eritrocitos, o las células del perfusado aisladas de dicho perfusado, comprenden aproximadamente el 6-7 % de células asesinas naturales ($CD3^-$, $CD56^+$); aproximadamente el 21-22 % de células T ($CD3^+$); aproximadamente el 6-7 % de células B ($CD19^+$); aproximadamente el 1-2 % de células progenitoras endoteliales ($CD34^+$, $CD31^+$); aproximadamente el 2-3 % de células progenitoras neurales (nestina$^+$); aproximadamente el 2-5 % de células progenitoras hematopoyéticas ($CD34^+$); y aproximadamente el 0.5-1.5 % de células madre placentarias adherentes (p. ej., $CD34^-$, $CD117^-$, $CD105^+$ y $CD44^+$), según se determina, p. ej., por citometría de flujo, p. ej., por análisis FACS.

Las células madre o progenitoras $CD34^+$ en el perfusado placentario humano expresan niveles detectablemente mayores de marcadores relacionados con la angiogénesis, p. ej., CD31, VEGF-R y/o CXCR4 de lo que lo hace un número equivalente de células $CD34^+$ aisladas de la sangre del cordón umbilical. En determinados casos, las células

mononucleares de perfusado placentario humano de una única perfusión que se cultivan en medio ENDOCULT® con VEGF (para el crecimiento de colonias CFU-Hill; StemCell Technologies, Inc.) generan hasta aproximadamente 20, p. ej., aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 colonias CFU-Hill (progenitores de células endoteliales). El desarrollo de colonias CFU-Hill en cultivo líquido puede demostrarse y evaluarse, p. ej., midiendo la captación de lipoproteína de baja densidad diacetilada (Dil-acLDL) por las células progenitoras endoteliales obtenidas de perfusado placentario humano, p. ej., a los siete días de cultivo en medio ENDOCULT®.

Además, las células $CD34^+CD45^-$ de perfusado placentario humano tienen una expresión detectablemente mayor de marcadores relacionados con la angiogénesis CD31 y/o VEGFR que las células $CD34^+CD45^+$.

Típicamente, el perfusado placentario y las células del perfusado tienen una baja expresión de MHC clase I comparado con las células sanguíneas del cordón umbilical, y son en gran medida negativas para los marcadores de MHC clase II.

4.2.6 Aislamiento, separación y caracterización de las células madre placentarias

Las células madre de la placenta de mamífero, ya se obtengan por perfusión o digestión enzimática, pueden purificarse inicialmente a partir de (es decir, pueden aislarse de) otras células por centrifugación en gradiente de Ficoll. Dicha centrifugación puede seguir cualquier protocolo estándar para velocidad de centrifugación, etc. En un ejemplo, las células recogidas de la placenta se recuperan del perfusado por centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, lo que separa las células de, p. ej., restos celulares y plaquetas contaminantes. En otro ejemplo, el perfusado placentario se concentra hasta aproximadamente 200 ml, se pone en capas suavemente sobre Ficoll, y se centrifuga a aproximadamente 1100 x g durante 20 minutos a 22 ºC, y la capa de células de la interfase de baja densidad se recoge para procesamiento adicional.

Los sedimentos celulares pueden resuspenderse en composición para la recogida de células madre fresca, o un medio adecuado para el mantenimiento de las células madre, p. ej., medio IMDM sin suero que contiene 2U/ml de heparina y EDTA 2mM (GibcoBRL, NY). La fracción de células mononucleares totales puede aislarse, p. ej., usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) según el procedimiento recomendado por el fabricante.

Tal y como se usa en la presente memoria, "aislar" células madre placentarias significa eliminar al menos aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células con las que están asociadas normalmente las células madre 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 está asociada normalmente la célula madre en el órgano intacto.

Las células placentarias obtenidas por perfusión o digestión pueden, por ejemplo, aislarse adicionalmente, o inicialmente, por tripsinización diferencial usando, p. ej., una disolución de tripsina al 0.05 % con EDTA al 0.2 % (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial es posible porque las células madre placentarias típicamente se despegan de las superficies de plástico en aproximadamente cinco minutos mientras otras poblaciones adherentes típicamente requieren más de 20-30 minutos de incubación. Las células madre placentarias despegadas pueden recogerse después de la tripsinización y neutralización de la tripsina, usando, p. ej., Disolución Neutralizante de Tripsina (TNS, Cambrex). En una realización del aislamiento de las células adherentes, se ponen partes alícuotas de, por ejemplo, aproximadamente 5-10 x 10^6 células en cada uno de varios matraces T-75, preferiblemente matraces T75 recubiertos de fibronectina. En dicha realización, las células pueden cultivarse con Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM) disponible comercialmente (Cambrex), y se pueden poner en un incubador de cultivo tisular (37 ºC, 5 % de CO_2). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se eliminan de los matraces por lavado con PBS. El PBS se reemplaza entonces por MSCGM. Los matraces se examinan preferiblemente diariamente para detectar la presencia de varios tipos de células adherentes y en particular, para la identificación y expansión de agrupaciones de células fibroblastoides.

El número y tipo de las células recogidas de una placenta de mamífero pueden monitorizarse, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y marcadores de la superficie celular usando técnicas de detección celular estándar tal como citometría de flujo, separación celular, inmunocitoquímica (p. ej., tinción con anticuerpos específicos de tejido o específicos de marcadores celulares) separación celular activada por fluorescencia (FACS), separación celular activada por magnetismo (MACS), por examen de la morfología de las células usando microscopía óptica o confocal, y/o midiendo los cambios en la expresión génica usando técnicas muy conocidas en la técnica, tales como PCR y perfilado de la expresión génica. Estas técnicas pueden usarse, también, para identificar células que son positivas para uno o más marcadores particulares. Por ejemplo, usando anticuerpos frente a CD34, se puede determinar, usando las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; si lo hace, la célula es $CD34^+$. Asimismo, si una célula produce suficiente ARN de OCT-4 que sea detectable por RT-PCR, o significativamente más ARN de OCT-4 que una célula adulta, la célula es $OCT\text{-}4^+$. Los anticuerpos frente a los

marcadores de superficie celular (p. ej., marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de los genes específicos de células madre, tales como OCT-4, son muy conocidos en la técnica.

Las células placentarias, particularmente las células que se han aislado por separación con Ficoll, adherencia diferencial, o una combinación de ambas, pueden separarse usando un separador celular activado por fluorescencia (FACS). La separación celular activada por fluorescencia (FACS) es un método muy conocido para separar partículas, incluyendo células, sobre la base de las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151: 150-165). La excitación con láser de los restos fluorescentes en las partículas individuales produce una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de las partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, se marcan anticuerpos o ligandos específicos de marcadores de superficie celular con distintos marcadores fluorescentes. Las células se procesan a través del separador celular, permitiendo la separación de las células sobre la base de su capacidad de unirse a los anticuerpos usados. Las partículas separadas por FACS pueden depositarse directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En un esquema de separación, las células madre de la placenta se separan sobre la base de la expresión de los marcadores CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 y/o HLA-G. Esto puede conseguirse en conexión con procedimientos para seleccionar células madre sobre la base de sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, un principio de selección por adherencia puede conseguirse antes o después de la separación sobre la base de la expresión de los marcadores. En un ejemplo, las células se separan en primer lugar sobre la base de su expresión de CD34; las células $CD34^-$ se retienen, y las células que son $CD200^+HLA\text{-}G^+$, se separan de todas las demás células $CD34^-$. En otro ejemplo, las células de la placenta se basan en su expresión los marcadores CD200 y/o HLA-G; por ejemplo, las células que presentan cualquiera de estos marcadores se aíslan para un uso adicional. Las células que expresan, p. ej., CD200 y/o HLA-G pueden, en un ejemplo específico, separarse adicionalmente sobre la base de su expresión de CD73 y/o CD105, o epítopos reconocidos por anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o ausencia de la expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, las células placentarias se separan por la expresión, o ausencia de la misma, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y las células placentarias que son $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$, $CD73^+$, $CD105^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$ se aíslan de las otras células placentarias para un uso adicional.

En otro ejemplo, pueden usarse lechos magnéticos para separar las células. Las células pueden separarse usando una técnica de separación celular activada por magnetismo (MACS), un método para separar partículas sobre la base de su capacidad de unirse a lechos magnéticos (diámetro de 0.5-100 µm). Puede realizarse una variedad de modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de anticuerpo que reconoce específicamente una molécula o hapteno particular de la superficie celular. Los lechos se mezclan entonces con las células para permitir la unión. Las células se pasan entonces a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de la superficie celular específico. En un ejemplo, estas células pueden aislarse entonces y volver a mezclarse con lechos magnéticos acoplados con un anticuerpo frente a marcadores de la superficie celular adicionales. Las células se pasan de nuevo a través de un campo magnético, aislando las células que están unidas a ambos anticuerpos. Dichas células pueden diluirse entonces en placas separadas, tales como placas de microtitulación para el aislamiento clonal.

Las células madre placentarias también pueden caracterizarse y/o separarse sobre la base de características de morfología y crecimiento celular. Por ejemplo, las células madre placentarias pueden caracterizarse como que tienen, y/o seleccionarse sobre la base, p. ej., de una apariencia fibroblastoide en cultivo. Las células madre placentarias también pueden caracterizarse como que tienen, y/o pueden seleccionarse, sobre la base de su capacidad para formar cuerpos semejantes a embrioides. En un ejemplo, las células placentarias que tienen una forma fibroblastoide, expresan CD73 y CD105, y producen uno o más cuerpos semejantes a embrioides en cultivo se aíslan de otras células placentarias. En otro ejemplo, las células placentarias $OCT\text{-}4^+$ que producen uno o más cuerpos semejantes a embrioides en cultivo se aíslan de otras células placentarias.

En otro ejemplo, las células madre placentarias pueden identificarse y caracterizarse por un ensayo de unidades formadoras de colonias. Los ensayos de unidades formadoras de colonias son conocidos comúnmente en la técnica, tales como medio MESEN CULT™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver Columbia Británica).

Las células madre placentarias pueden evaluarse para determinar su viabilidad, potencial de proliferación, y longevidad usando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como ensayo de exclusión de azul de tripán, ensayo de captación de diacetato de fluoresceína, ensayo de captación de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y ensayo de captación de timidina, ensayo de proliferación celular basado en MTT (para evaluar la proliferación). La longevidad puede determinarse por métodos muy conocidos en la técnica, tales como por la determinación del número máximo de duplicación de la población en un cultivo prolongado.

Las células madre placentarias también pueden separarse de otras células placentarias usando otras técnicas conocidas en la técnica, p. ej., crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva

de las células no deseadas (selección negativa); separación basada en la capacidad de aglutinación 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 contracorriente); separación por gravedad unitaria; distribución contracorriente; electroforesis; y semejantes.

4.3 Cultivo de las células madre placentarias

4.3.1 Medios de cultivo

Las células madre placentarias aisladas, o población de células madre placentarias, o células o tejido placentario a partir del que se crecen las células madre placentarias, pueden usarse para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células se transfieren generalmente a recipientes de cultivo tisular estériles bien no recubiertos o recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (p. ej., nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de la membrana extracelular {p. ej., MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

Las células madre placentarias pueden cultivarse en cualquier medio, y bajo cualesquiera condiciones, reconocidas en la técnica como aceptables para el cultivo de las células madre. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende suero. Las células madre placentarias pueden cultivarse, por ejemplo, en DMEM-LG (Medio Esencial Modificado por Dulbecco, con bajo contenido en glucosa)/MCDB 201 (medio basal de fibroblastos de pollo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA+BSA (ácido linoleico-albúmina de suero bovino), dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1, y penicilina/estreptomicina; DMEM-HG (alto contenido en glucosa) que comprende 10 % de suero fetal bovino (FBS); DMEM-HG que comprende 15 % de FBS; IMDM (medio de Dulbecco modificado por Iscove) que comprende 10 % de FBS, 10 % de suero de caballo, e hidrocortisona; M199 que comprende 10 % de FBS, EGF, y heparina; α-MEM (medio mínimo esencial) que comprende 10 % de FBS, GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende 10 % de FBS, GLUTAMAX™ y gentamicina, etc. Un medio preferido es DMEM-LG/MCDB-201 que comprende 2 % de FBS, ITS, LA+BSA, dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, y penicilina/estreptomicina.

Otros medios que pueden usarse para cultivar células madre placentarias incluyen DMEM (con contenido alto o bajo de glucosa), medio basal de Eagle, medio de Ham F10 (F10), medio de Ham F-12 (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, Medio para el Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM), medio de Liebovitz L-15, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), y CELL-GRO FREE.

El medio de cultivo puede suplementarse con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero (p. ej., suero bovino fetal (FBS), preferiblemente aproximadamente al 2-15 % (v/v); suero equino (de caballo) (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferiblemente aproximadamente al 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 semejante a insulina 1 (IGF-1), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más antibióticos y/o agentes antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina, y nistatina, bien solos o en combinación.

Las células madre placentarias pueden cultivarse en condiciones de cultivo tisular estándar, p. ej., en placas de cultivo tisular o en placas de múltiples pocillos. Las células madre placentarias también pueden cultivarse usando un método de gota colgante. En este método, las células madre placentarias se suspenden a aproximadamente 1 x 10^4 células por mL en aproximadamente 5 mL de medio, y se ponen una o más gotas del medio en el interior de la tapa de un contenedor de cultivo tisular, p. ej., una placa Petri de 100 mL. Las gotas pueden ser, p. ej., gotas únicas, o múltiples gotas de, p. ej., un pipeteador con múltiples canales. La tapa se invierte cuidadosamente y se pone en la parte superior de la parte inferior de la placa, que contiene un volumen de líquido, p. ej., PBS estéril suficiente para mantener el contenido de humedad en la atmósfera de la placa, y las células madre se cultivan.

4.3.2 Expansión y proliferación de las células madre placentarias

Una vez una célula madre placentaria aislada, o población aislada de células madre (p. ej., una célula madre o población de células madre separada de al menos aproximadamente el 50 % de las células placentarias con las que la célula madre o población de células madre está asociada normalmente *in vivo*), la célula madre o población de células madre puede proliferarse y expandirse *in vitro*. Por ejemplo, una población de células madre placentarias puede cultivarse en contenedores de cultivo tisular, p. ej., placas, matraces, placas con múltiples pocillos, o semejantes, durante un tiempo suficiente para que las células madre proliferen hasta un 70- 90 % de confluencia, esto es, hasta que las células madre y su progenie ocupen el 70-90 % del área superficial del cultivo del contenedor de cultivo tisular.

Las células madre placentarias para uso en la invención pueden sembrarse en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. Por ejemplo, las células pueden sembrarse a una densidad baja (p. ej., aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000 células/cm^2) a una densidad alta (p. ej., aproximadamente 50 000

o más células/cm^2). En una realización preferida, las células se cultivan a aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO_2 en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan a aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O_2 en aire, preferiblemente aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento de O_2 en aire. Las células preferiblemente se cultivan a aproximadamente 25 ºC a aproximadamente 40 ºC, preferiblemente 37 ºC. Las células se cultivan preferiblemente en un incubador. El medio de cultivo puede estar estático o agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. Las células madre placentarias preferiblemente se crecen bajo estrés oxidativo bajo (p. ej., con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína, o semejantes).

Una vez se obtiene un 70 %-90 % de confluencia, las células pueden subcultivarse. Por ejemplo, las células pueden tratarse enzimáticamente, p. ej., tripsinizarse, usando técnicas muy conocidas en la técnica, para separarlas de la superficie del cultivo tisular. Después de retirar las células pipeteando y contando las células, se subcultivan aproximadamente 20 000-100 000 células madre, preferiblemente aproximadamente 50 000 células madre, en un nuevo contenedor de cultivo que contiene medio de cultivo fresco. Típicamente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del que se retiraron las células madre. En la presente memoria se proporcionan poblaciones de células madre placentarias para uso en la invención que se han subcultivado al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, o 20 veces, o más.

4.3.3 Poblaciones de células madre placentarias

Además, las composiciones para uso en la invención pueden comprender poblaciones de células madre placentarias par uso en la invención. La población de células madre placentarias para uso en la invención puede aislarse directamente de una o más placentas; esto es, la población de células madre placentarias para uso en la invención puede ser una población de células placentarias, que comprende células madre placentarias, obtenidas a partir de, o contenidas en, perfusado, u obtenidas a partir de, o contenidas en, digerido (esto es, la colección de células obtenida por digestión enzimática de una placenta o parte de la misma). Las células madre placentarias aisladas para uso en la invención también pueden cultivarse y expandirse para producir poblaciones de células madre placentarias. Las poblaciones de células placentarias que comprenden células madre placentarias también pueden cultivarse y expandirse para producir poblaciones de células madre placentarias.

Las poblaciones de células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria comprenden células madre placentarias para uso en la invención. En varias realizaciones, al menos aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % de las células en una población de células madre placentarias aisladas son células madre placentarias. Esto es, una población de células madre placentarias puede comprender, p. ej., tanto como el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % de células que no son células madre.

En la presente memoria se proporcionan métodos para producir una población de células madre placentarias aisladas para uso en la invención, p. ej., seleccionando células madre placentarias, ya deriven de digestión enzimática o perfusión, que expresan marcadores particulares y/o características particulares de cultivo o morfológicas. En una realización, por ejemplo, en la presente memoria se proporciona un método para producir una población de células que comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD200 y HLA-G; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otra realización, el método para producir una población de células comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73, CD105, y CD200; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otra realización, el método para producir una población de células comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD200 y OCT-4; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro ejemplo, el método para producir una población de células comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de un cuerpo semejante a embrioide; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro ejemplo, el método para producir una población de células comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro ejemplo, el método para producir una población de células comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de un cuerpo semejante a embrioide; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En cualquiera de los ejemplos anteriores, el método puede comprender adicionalmente seleccionar células placentarias que expresan ABC-p (una proteína transportadora ABC específica de la placenta; véase, p. ej., Allikmets *et al.*, *Cancer Res.* 58(23):5337-9 (1998)). El método también puede comprender seleccionar células que presentan al menos una característica específica, p. ej., de una célula madre mesenquimal,

por ejemplo, la expresión de CD29, la expresión de CD44, la expresión de CD90, o la expresión de una combinación de los anteriores.

En las realizaciones anteriores, el sustrato puede ser cualquier superficie en la que puede conseguirse el cultivo y/o selección de las células, p. ej., células madre placentarias. Típicamente, el sustrato es un plástico, p. ej., plástico de placa de cultivo tisular o placa con múltiples pocillos. El plástico de cultivo tisular puede estar recubierto con una biomolécula, p. ej., laminina o fibronectina.

Las células, p. ej., células madre placentarias, pueden seleccionarse para una población de células madre placentarias por cualquier medio conocido en la técnica de la selección celular. Por ejemplo, las células pueden seleccionarse usando un anticuerpo o anticuerpos frente a uno o más marcadores de la superficie celular, por ejemplo, en citometría de flujo o FACS. La selección puede conseguirse usando anticuerpos conjuntamente con lechos magnéticos. Los anticuerpos que son específicos para determinados marcadores relacionados con células madre son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos frente a OCT-4 (Abeam, Cambridge, MA), CD200 (Abeam), HLA-G (Abeam), CD73 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), CD105 (Abeam; BioDesign International, Saco, ME), etc. También están disponibles comercialmente anticuerpos frente a otros marcadores, p. ej., CD34, CD38 y CD45 están disponibles, p. ej., en StemCell Technologies o BioDesign International.

La población de células madre placentarias aislada puede comprender células placentarias que no son células madre, o células que no son células placentarias.

Las poblaciones de células madre placentarias aisladas pueden combinarse con una o más poblaciones de células que no son células madre o células que no son placentarias. Por ejemplo, una población aislada de células madre placentarias puede combinarse con sangre (p. ej., sangre placentaria o sangre del cordón umbilical), células madre derivadas de la sangre (p. ej., células madre derivadas de sangre placentaria o sangre del cordón umbilical), poblaciones de células nucleadas derivadas de la sangre, células mesenquimales derivadas de la médula ósea, poblaciones de células madre derivadas del hueso, médula ósea cruda, células madre adultas (somáticas), poblaciones de células madre contenidas en tejido, células madre cultivadas, poblaciones de células completamente diferenciadas (p. ej., condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células musculares, células cardiacas, etc.) y semejantes. Las células en una población de células madre placentarias aislada pueden combinarse con una pluralidad de células de otro tipo en relaciones de aproximadamente 100 000 000:1, 50 000 000:1, 20 000 000:1, 10 000 000:1, 5 000 000:1, 2 000 000:1, 1 000 000:1, 500 000:1, 200 000:1, 100 000:1, 50 000:1, 20 000:1, 10 000:1, 5000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:5000; 1:10 000; 1:20 000; 1:50 000; 1:100 000; 1:500 000; 1:1 000 000; 1:2 000 000; 1:5 000 000; 1:10 000 000; 1:20 000 000; 1:50 000 000; o aproximadamente 1:100 000 000, números comparativos de células nucleadas totales en cada población. Las células en una población de células madre placentarias aislada también pueden combinarse con una pluralidad de células de una pluralidad de tipos celulares.

En una, una población aislada de células madre placentarias se combina con una pluralidad de células madre hematopoyéticas. Dichas células madre hematopoyéticas pueden estar, por ejemplo, contenidas en la placenta no procesada, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en células nucleadas totales de sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en una población aislada de células $CD34^+$ de sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en médula ósea no procesada; en células nucleadas totales de médula ósea; en una población aislada de células $CD34^+$ de la médula ósea, o semejantes.

4.4 Combinaciones de las células madre placentarias y perfusado placentario o células de perfusado placentario

En la presente memoria se describen combinaciones de perfusado placentario con células de perfusado placentario aisladas y/o células madre placentarias proporcionadas. En la presente memoria, las células madre placentarias pueden ser células madre placentarias $CD34^+$, células madre placentarias CD34-, o una combinación de las mismas. En un ejemplo, en la presente memoria se describe un volumen de perfusado placentario suplementado con una pluralidad de células de perfusado placentario y/o una pluralidad de células madre placentarias. En ejemplos específicos, por ejemplo, cada mililitro de perfusado placentario se suplementa con aproximadamente 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6 o más células de perfusado placentario o células madre placentarias. En otro ejemplo, una pluralidad de células de perfusado placentario se suplementa con perfusado placentario y/o células madre placentarias. En otro ejemplo, una pluralidad de células madre placentarias se suplementa con perfusado placentario y/o una pluralidad de células de perfusado placentario. En determinados ejemplos, cuando se usa perfusado para suplementación, el volumen de perfusado es aproximadamente, mayor de aproximadamente, o menor de aproximadamente, el 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % o 1 % del volumen total de las células (en disolución) más el perfusado. Cuando se usan las células de perfusado placentario para suplementar una pluralidad de células madre placentarias, las células de perfusado placentario generalmente comprenden aproximadamente, más de aproximadamente, o menos de aproximadamente, el 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % o 1 % del número total de las células de perfusado placentario

más las células madre placentarias. De forma similar, cuando se usan las células madre placentarias para suplementar una pluralidad de células de perfusado placentario, las células madre placentarias generalmente comprenden aproximadamente, más de aproximadamente, o menos de aproximadamente, el 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % o 1 % del número total de las células de perfusado placentario más las células madre placentarias. Cuando se usan las células madre placentarias o células de perfusado placentario para suplementar el perfusado placentario, el volumen de disolución (p. ej., disolución salina, medio de cultivo o semejantes) en el que las células se suspenden comprende aproximadamente, más de aproximadamente, o menos de aproximadamente, el 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % o 1 % del volumen total de perfusado más células, donde las células madre placentarias se suspenden a aproximadamente 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 o más células por mililitro antes de la suplementación.

En la presente memoria se describe además perfusado placentario combinado que se obtiene a partir de dos o más fuentes, p. ej., dos o más placentas, y se combinan, p. ej., se juntan. Dicho perfusado combinado puede comprender aproximadamente volúmenes iguales de perfusado de cada fuente, o puede comprender diferentes volúmenes de cada fuente. Los volúmenes relativos de cada fuente pueden seleccionarse aleatoriamente, o pueden estar basados, p. ej., en una concentración o cantidad de uno o más factores celulares, p. ej., citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, o semejantes; el número de las células placentarias en el perfusado de cada fuente; u otras características del perfusado de cada fuente. El perfusado de múltiples perfusiones de la misma placenta puede combinarse de forma similar.

De forma similar, en la presente memoria se describen células de perfusado placentario, y células madre placentarias, que se obtienen a partir de dos o más fuentes, p. ej., dos o más placentas, y se combinan. Dichas células combinadas pueden comprender números aproximadamente iguales de las células de las dos o más fuentes, o números diferentes de las células de una o más de las fuentes combinadas. Los números relativos de las células de cada fuente pueden seleccionarse sobre la base, p. ej., del número de uno o más tipos celulares específicos en las células que se van a combinar, p. ej., el número de células madre $CD34^-$, etc.

Los combinados pueden comprender, p. ej., perfusado placentario suplementado con células de perfusado placentario; perfusado placentario suplementado con células madre placentarias; perfusado placentario suplementado tanto con células de perfusado placentario como con células madre placentarias; células de perfusado placentario suplementadas con perfusado placentario; células de perfusado placentario suplementadas con células madre placentarias; células de perfusado placentario suplementadas tanto con perfusado placentario como con células madre placentarias; células madre placentarias suplementadas con perfusado placentario; células madre placentarias suplementadas con células de perfusado placentario; o células madre placentarias suplementadas tanto con células de perfusado placentario como con perfusado placentario.

En determinados ejemplos, el perfusado placentario, células de perfusado placentario, y células madre placentarias se proporcionan como unidades administrables de grado farmacéutico. Dichas unidades pueden proporcionarse en volúmenes discretos, p. ej., 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL, 500 mL, o semejantes. Dichas unidades pueden proporcionarse de manera que contengan un número especificado, p. ej., de células de perfusado placentario, células asesinas naturales intermedias derivadas de perfusado placentario, o ambas, p. ej., 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 o más células por mililitro, o 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} o más células por unidad. Dichas unidades pueden proporcionarse de manera que contengan números especificados de dos cualquiera, o los tres, de perfusado placentario, células de perfusado placentario, y/o células madre placentarias.

En las combinaciones anteriores de perfusado placentario, células de perfusado placentario y/o células madre placentarias, uno cualquiera, dos cualquiera, o los tres del perfusado placentario, células de perfusado placentario y/o células madre placentarias pueden ser autólogos para un receptor (esto es, se obtiene del receptor), u homólogos para un receptor (esto es, se obtiene de al menos otro individuo distinto de dicho receptor).

En la presente memoria también se proporcionan composiciones para uso en la invención que comprenden células madre placentarias adherentes $CD200^+$ en combinación con células de perfusado placentario y/o perfusado placentario. Así, en otro aspecto, en la presente memoria se proporciona dicha composición que comprende dichas células madre placentarias, en donde dichas células madre se aíslan de perfusado placentario, y en donde dichas células madre placentarias comprenden al menos el 50 % de las células en la composición. En una realización específica, dichas células madre placentarias comprenden al menos el 80 % de las células en la composición. En otra realización específica, la composición comprende perfusado placentario aislado. En una realización más específica, dicho perfusado placentario es del mismo individuo que dichas células madre placentarias. En otra realización más específica, dicho perfusado placentario comprende perfusado placentario de un individuo diferente que dichas células

madre placentarias. En otra realización específica, la composición comprende células de perfusado placentario. En una realización más específica, dichas células de perfusado placentario son del mismo individuo que dichas células madre placentarias. En otra realización más específica, dichas células de perfusado placentario son de un individuo diferente que dichas células madre placentarias. En otra realización específica, la composición comprende adicionalmente perfusado placentario aislado y células de perfusado placentario aislado, en donde dicho perfusado aislado y dichas células de perfusado placentario aislado son de diferentes individuos. En otra realización más específica de cualquiera de las realizaciones anteriores que comprenden perfusado placentario, dicho perfusado placentario comprende perfusado placentario de al menos dos individuos. En otra realización más específica de cualquiera de las realizaciones anteriores que comprenden células de perfusado placentario, dichas células de perfusado placentario aislado son de al menos dos individuos.

4.5 Producción de un banco de células madre placentarias

Las células madre de placentas postparto pueden cultivarse de varias maneras diferentes para producir un conjunto de lotes, p. ej., un conjunto de dosis administrables individualmente, de las células madre placentarias. Dichos lotes pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de células madre de perfusado placentario o de tejido placentario digerido con enzimas. Los conjuntos de lotes de las células madre placentarias, obtenidos de una pluralidad de placentas, pueden organizarse en un banco de células madre placentarias, p. ej., para almacenamiento a largo plazo. Generalmente, las células madre adherentes se obtienen a partir de un cultivo inicial de material placentario para formar un cultivo de siembra, que se expande en condiciones controladas para formar poblaciones de células con números aproximadamente equivalentes de duplicaciones. Los lotes derivan preferiblemente del tejido de una única placenta, pero pueden derivar del tejido de una pluralidad de placentas.

En un ejemplo, los lotes de células madre se obtienen como sigue. El tejido placentario se disrumpe en primer lugar, p. ej., por troceado, se digiere con una enzima adecuada, p. ej., colagenasa (véase la Sección 5.2.3, anteriormente). El tejido placentario comprende preferiblemente, p. ej., el amnios completo, corion completo, o ambos, de una única placenta, pero puede comprender solo una parte bien del amnios o corion. El tejido digerido se cultiva, p. ej., durante aproximadamente 1-3 semanas, preferiblemente aproximadamente 2 semanas. Después de la eliminación de las células no adherentes, las colonias de alta densidad que se forman se recogen, p. ej., por tripsinización. Estas células se recogen y resuspenden en un volumen conveniente de medio de cultivo, y se definen como células de Subcultivo 0.

Las células de Subcultivo 0 se usan entonces para sembrar los cultivos de expansión. Los cultivos de expansión pueden ser cualquier organización de aparatos de cultivo celular separados, p. ej., una Cell Factory por NUNC™. Las células en el cultivo de Subcultivo 0 pueden subdividirse en cualquier grado de manera que se siembran cultivos de expansión con, p. ej., 1×10^3, 2×10^3, 3×10^3, 4×10^3, 5×10^3, 6×10^3, 7×10^3, 8×10^3, 9×10^3, 1×10^4, 1×10^4, 2×10^4, 3×10^4, 4×10^4, 5×10^4, 6×10^4, 7×10^4, 8×10^4, 9×10^4, o 10×10^4 células madre. Preferiblemente, se usan de aproximadamente 2×10^4 a aproximadamente 3×10^4 células de Subcultivo 0 para sembrar cada cultivo de expansión. El número de los cultivos de expansión puede depender del número de células de Subcultivo 0, y puede ser mayor o menor en número dependiendo de la o las placentas particulares a partir de las que se obtienen las células madre.

Los cultivos de expansión se crecen hasta que la densidad de las células en el cultivo alcanza un determinado valor, p. ej., aproximadamente 1×10^5 células/cm^2. Las células pueden bien recogerse y criopreservarse en este punto, o subcultivarse en nuevos cultivos de expansión como se ha descrito anteriormente. Las células pueden subcultivarse, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces antes de su uso. Preferiblemente, se mantiene un registro del número acumulativo de duplicaciones de las poblaciones durante el o los cultivos de expansión. Las células de un cultivo de Subcultivo 0 pueden expandirse durante 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, o hasta 60 duplicaciones. Preferiblemente, sin embargo, el número de duplicaciones de las poblaciones, antes de dividir la población de las células en dosis individuales, es entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30, preferiblemente aproximadamente 20 duplicaciones. Las células pueden cultivarse continuamente a lo largo del proceso de expansión, o pueden congelarse en uno o más puntos durante la expansión.

Las células que se van a usar para dosis individuales pueden congelarse, p. ej., criopreservarse para un uso posterior. Las dosis individuales pueden comprender, p. ej., aproximadamente 1 millón a aproximadamente 100 millones de células por ml, y pueden comprender entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^9 células en total.

En un ejemplo específico del método, las células del Subcultivo 0 se cultivan durante aproximadamente 4 duplicaciones, después se congelan en un primer banco de células. Las células del primer banco de células se congelan y se usan para sembrar un segundo banco de células, cuyas células se expanden durante aproximadamente otras ocho duplicaciones. Las células en este estadio se recogen y se congelan y se usan para sembrar nuevos cultivos de expansión que se dejan continuar durante aproximadamente ocho duplicaciones adicionales, llevando el número

de acumulativo de duplicaciones celulares hasta aproximadamente 20. Las células en los puntos intermedios en el subcultivo pueden congelarse en unidades de aproximadamente 100 000 a aproximadamente 10 millones de células por ml, preferiblemente aproximadamente 1 millón de células por ml para su uso en cultivos de expansión posteriores. Las células a aproximadamente 20 duplicaciones pueden congelarse en dosis individuales de entre aproximadamente 1 millón a aproximadamente 100 millones de células por ml para administración o uso en la preparación de una composición que contiene células madre.

Preferiblemente, el donante del que se obtiene la placenta (p. ej., la madre) se ensaya para al menos un patógeno. Si los ensayos de la madre son positivos para un patógeno ensayado, se desecha el lote completo de la placenta. Dicho ensayo puede realizarse en cualquier momento durante la producción de los lotes de las células madre placentarias, incluyendo antes o después del establecimiento de las células de Subcultivo 0, o durante el cultivo de expansión. Los patógenos cuya presencia se ensaya pueden incluir, sin limitación, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, virus de la inmunodeficiencia humana (tipos I y II), citomegalovirus, herpesvirus, y semejantes.

4.6 Diferenciación de células madre placentarias adherentes

4.6.1 Inducción de la diferenciación en células neuronales o neurogénicas

La diferenciación neuronal de las células madre placentarias puede conseguirse, por ejemplo, poniendo las células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en neuronas. En un método de ejemplo, un medio neurogénico comprende DMEM/20 % de FBS y beta-mercaptoetanol 1 mM; dicho medio puede remplazarse después del cultivo durante aproximadamente 24 horas con medio que consiste en DMEM y betamercaptoetanol 1-10 mM. En otro ejemplo, las células se ponen en contacto con DMEM/2 % de DMSO/hidroxianisol butilado 200 µM. En un ejemplo específico, el medio de diferenciación comprende DMEM F-12 sin suero, hidroxianisol butilado, cloruro de potasio, insulina, forskolina, ácido valproico, e hidrocortisona. En otro ejemplo, la diferenciación neuronal se consigue sembrando en placas las células madre placentarias en placas recubiertas con laminina en medio Neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad CA) que contiene suplemento B27 y L-glutamina, suplementado opcionalmente con bFGF y/o EGF. Las células madre placentarias también pueden inducirse para la diferenciación neural por cocultivo con células neurales, o cultivo en medio condicionado de neuronas.

La diferenciación neuronal puede evaluarse, p. ej., por la detección de morfología semejante a neurona (p. ej., células bipolares que comprenden procesos extendidos) detección de la expresión p. ej., de receptor del factor de crecimiento nervioso y genes de cadena pesada de neurofilamentos por RT/PCR; o detección de actividad eléctrica, p. ej., por registro zonal.

4.6.2 Inducción de la diferenciación en células adipogénicas

La diferenciación adipogénica de las células madre placentarias puede conseguirse, por ejemplo, poniendo las células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en adipocitos. Un medio adipogénico preferido comprende MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con 15 % de suero de sangre del cordón. En un ejemplo, las células madre placentarias se alimentan con Medio de Inducción de la Adipogénesis (Cambrex) y se cultivan durante 3 días (a 37 ºC, 5 % de CO_2), seguido de 1-3 días de cultivo en Medio de Mantenimiento de la Adipogénesis (Cambrex). Después de 3 ciclos completos de inducción/mantenimiento, las células se cultivan durante 7 días adicionales en medio de mantenimiento de la adipogénesis, reemplazando el medio cada 2-3 días.

En otro ejemplo, las células madre placentarias se cultivan en medio que comprende dexametasona 1 µM, indometacina 0.2 mM, 0.01 mg/ml de insulina, IBMX 0.5 mM, DMEM con alto contenido en glucosa, FBS, y antibióticos. Las células madre placentarias también pueden inducirse hacia la adipogénesis por cultivo en medio que comprende uno o más glucocorticoides (p. ej., dexametasona, indometasona, hidrocortisona, cortisona), insulina, un compuesto que eleva los niveles intracelulares de AMPc (p. ej., dibutiril-AMPc; 8-CPT-AMPc (8-(4)clorofeniltio)-adenosina, 3', 5' monofosfato cíclico); 8-bromo-AMPc; dioctanoil-AMPc; forskolina) y/o un compuesto que inhibe la degradación de AMPc (p. ej., un inhibidor de fosfodiesterasa tal como isobutilmetilxantina (IBMX), metil isobutilxantina, teofilina, cafeína, indometacina).

Una característica distintiva de la adipogénesis es el desarrollo de múltiples vesículas lipídicas intracitoplásmicas que pueden observarse fácilmente usando la tinción lipofílica aceite rojo O. La expresión de genes de lipasa y/o de proteína de unión a ácidos grasos se confirma por RT/PCR en las células madre placentarias que han empezado a diferenciarse en adipocitos.

4.6.3 Inducción de la diferenciación en células condrocíticas

La diferenciación condrogénica de las células madre placentarias puede conseguirse, por ejemplo, poniendo las células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en condrocitos. Un medio

condrocítico preferido comprende MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con 15 % de suero de sangre del cordón. Por ejemplo, las células madre placentarias se dividen en partes alícuotas en un tubo de polipropileno estéril, se centrifugan (p. ej., a 150 x g durante 5 minutos), y se lavan dos veces en Medio de Condrogénesis Incompleto (Cambrex). Las células se resuspenden en Medio de Condrogénesis Completo (Cambrex) que contiene 0.01 µg/ml de TGF-beta-3 a una concentración de aproximadamente 1-20 x 10^5 células/ml. En otros ejemplos, las células madre placentarias se ponen en contacto con factores de crecimiento exógenos, p. ej., GDF-5 o factor de crecimiento transformante beta3 (TGF-beta3), con o sin ascorbato. El medio condrogénico puede suplementarse con aminoácidos incluyendo prolina y glutamina, piruvato de sodio, dexametasona, ácido ascórbico, e insulina/transferrina/selenio. El medio condrogénico puede suplementarse con hidróxido de sodio y/o colágeno. Las células madre placentarias pueden cultivarse a una densidad alta o baja. Las células se cultivan preferiblemente en ausencia de suero.

La condrogénesis puede evaluarse, p. ej., por observación de la producción de sustancia de fondo eosinofílico, tinción con safranina-O para la expresión de glicosaminoglicano; tinción con hematoxilina/eosina, evaluación de la morfología celular, y/o confirmación por RT/PCR de la expresión génica de colágeno 2 y colágeno 9. La condrogénesis también puede observarse creciendo las células madre en un sedimento, formado, p. ej., centrifugando suavemente las células madre en suspensión (p. ej., a aproximadamente 800g durante aproximadamente 5 minutos). Después de aproximadamente 1-28 días, el sedimento de las células madre empieza a formar una matriz firme y demuestra una integridad estructural no encontrada en líneas celulares no inducidas, o no condrogénicas, cuyos sedimentos tienden a separarse cuando se pulsan. La condrogénesis también puede demostrarse, p. ej., en dichos sedimentos celulares, tiñendo con una tinción que tiñe el colágeno, p. ej., Rojo Sirio, y/o una tinción que tiñe glicosaminoglicanos (GAG), tales como, p. ej., Azul Alcián.

4.6.4 Inducción de la diferenciación en células osteogénicas

La diferenciación osteogénica de las células madre placentarias puede conseguirse, por ejemplo, poniendo las células madre placentarias para uso en la invención en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en células osteogénicas. Un medio osteocítico preferido comprende MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con 15 % de suero de sangre del cordón, seguido de Medio de Inducción Osteogénica (Cambrex) que contiene dexametasona 0.1 µM, ácido ascórbico-2-fosfato 0.05 mM, beta glicerofosfato 10 mM. En otra realización, las células madre placentarias se cultivan en medio (p. ej., DMEM con bajo contenido en glucosa) que contiene dexametasona a aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-9} M, sal fosfato de ascorbato aproximadamente 10- 50 µM (p. ej., ascorbato-2-fosfato) y β-glicerofosfato aproximadamente 10 nM a aproximadamente 10 mM. El medio osteogénico también puede incluir suero, uno o más agentes antibióticos/antimicóticos, factor de crecimiento transformante-beta (p. ej., TGF-β1) y/o proteína morfogénica ósea (p. ej., BMP-2, BMP-4, o una combinación de las mismas).

La diferenciación puede ensayarse usando una tinción específica de calcio, p. ej., tinción de von Kossa, y detección por RT/PCR, p. ej., de la expresión génica de la fosfatasa alcalina, osteocalcina, sialoproteína ósea y/o osteopontina.

4.6.5 Inducción de la diferenciación en células pancreáticas

La diferenciación de las células madre placentarias en células pancreáticas productoras de insulina puede conseguirse, por ejemplo, poniendo las células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en células pancreáticas.

Un ejemplo de medio pancreagénico comprende DMEM/20 % de CBS, suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/ml; y factor de crecimiento transformante beta-1, 2 ng/ml. Este medio se combina con medio condicionado de cultivos de células neuronales positivas para nestina a 50/50 v/v. Puede usarse Reemplazo de Suero KnockOut en lugar de CBS. Las células se cultivan durante 14-28 días, con realimentación cada 3-4 días.

La diferenciación puede confirmarse ensayando, p. ej., la producción de la proteína insulina, o la expresión génica de la insulina por RT/PCR.

4.6.6 Inducción de la diferenciación en células cardiacas

La diferenciación miogénica (cardiogénica) de las células madre placentarias puede conseguirse, por ejemplo, poniendo las células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en cardiomiocitos. Un medio cardiomiocítico preferido comprende DMEM/20 % de CBS suplementado con ácido retinoico, 1 µM; factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/ml; y factor de crecimiento transformante beta-1, 2 ng/ml; y factor de crecimiento epidérmico, 100 ng/ml. Puede usarse Reemplazo de Suero KnockOut (Invitrogen, Carlsbad, California) en lugar de CBS. Alternativamente, las células madre placentarias se cultivan en DMEM/20 % de CBS suplementado con 50 ng/ml de Cardiotropina-1 durante 24 horas. En otro ejemplo, las células madre placentarias pueden cultivarse 10-14 días en medio sin proteínas durante 5-7 días, después estimularse con extracto de miocardio humano, p. ej., producido por homogeneización de miocardio humano en tampón 1 % de HEPES suplementado con 1 % de suero de sangre del cordón.

La diferenciación puede confirmarse por la demostración de la expresión génica de la actina cardiaca, p. ej., por RT/PCR.

4.7 Preservación de las células madre placentarias

Las células madre placentarias para uso en la invención pueden preservarse, esto es, ponerse bajo condiciones que permiten el almacenamiento a largo plazo, o condiciones que inhiben la muerte celular, p. ej., apoptosis o necrosis.

Las células madre placentarias para uso en la invención pueden preservarse usando, p. ej., una composición que comprende un inhibidor de la apoptosis, inhibidor de la necrosis y/o un perfluorocarbono que porta oxígeno, como se describe en la Solicitud Provisional U.S. relacionada No. 60/754 969, titulada "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs", presentada el 25 de diciembre, 2005. En una realización, en la presente memoria se proporciona un método para preservar una población de células madre placentarias para uso en la invención que comprende poner en contacto dicha población de las células madre con una composición para la recogida de células madre que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono que porta oxígeno, en donde 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 las células madre, comparado con una población de células madre que no se ha 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. En otra realización, dicha composición para la recogida de las células madre comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho un perfluorocarbono que porta oxígeno en fases separadas. En otra realización, dicha composición para la recogida de las células madre comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono que porta oxígeno en una emulsión. En otra realización, la composición para la recogida de las células madre comprende adicionalmente un emulsionante, p. ej., lecitina. En otra realización, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 0 ºC y aproximadamente 25 ºC en el momento en el que se ponen en contacto con las células madre. En otra realización más específica, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 2 ºC y 10 ºC, o entre aproximadamente 2 ºC y aproximadamente 5 ºC, en el momento en el que se ponen en contacto con las células madre. En otra realización más específica, dicha puesta de contacto se realiza durante el transporte de dicha población de las células madre. En otra realización más específica, dicha puesta de contacto se realiza durante la congelación y descongelación de dicha población de las células madre.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para preservar una población de células madre placentarias para uso en la invención que comprende poner en contacto dicha población de las células madre con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto conservante de órganos, en donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis en la población de las células madre, comparado con una población de células madre que no se ha puesto en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, el compuesto conservante de órganos es disolución UW (descrita en la Patente U.S. No. 4 798 824; también conocida como ViaSpan; véase también, Southard *et al.*, *Transplantation* 49(2):251 -257 (1990)) o una disolución descrita en Stern *et al.*, Patente U.S. No. 5 552 267. En otra realización, dicho compuesto conservante de órganos es hidroxietil almidón, ácido lactobiónico, rafinosa, o una combinación de los mismos. En otra realización, la composición para la recogida de las células madre comprende adicionalmente un perfluorocarbono que porta oxígeno, bien en dos fases o como una emulsión.

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

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

Las células madre placentarias proporcionadas en la presente memoria pueden criopreservarse, p. ej., en medio de criopreservación en contenedores pequeños, p. ej., ampollas. El medio de criopreservación adecuado incluye, pero no está limitado a, medio de cultivo incluyendo, p. ej., medio de crecimiento, o medio de congelación de células, por ejemplo, medio de congelación de células disponible comercialmente, p. ej., C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de criopreservación comprende preferiblemente DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración, p. ej., de aproximadamente el 10 % (v/v). El medio de criopreservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las células madre placentarias se enfrían preferiblemente a aproximadamente 1 °C/min durante la criopreservación. Una temperatura de criopreservación preferida es aproximadamente -80 ºC a aproximadamente -180 ºC, preferiblemente aproximadamente -125 ºC a aproximadamente -140 ºC. Las células criopreservadas pueden transferirse a nitrógeno líquido antes de la descongelación para el uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez las ampollas han alcanzado aproximadamente -90 ºC, se transfieren a un área de almacenamiento con nitrógeno líquido. Las células criopreservadas se descongelan preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 25 ºC a aproximadamente 40 ºC, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37 ºC.

4.8 Usos de las células madre placentarias

4.8.1 Perfusado placentario, células madre y poblaciones de células madre

Las poblaciones de células madre placentarias pueden usarse para tratar cualquier enfermedad, trastorno o afección que es susceptible de tratamiento por la administración de una población de células madre. Tal y como se usa en la presente memoria, "tratar" engloba la cura de, remedio de, mejora de, disminución de la gravedad de, o reducción de la evolución temporal de, una enfermedad, trastorno o afección, o cualquier parámetro o síntoma de los mismos.

Las células madre placentarias, y poblaciones de células madre placentarias, pueden inducirse para que se diferencien en un tipo celular particular, bien *ex vivo* o *in vivo*, en la preparación para la administración a un individuo que necesita las células madre, o células diferenciadas a partir de células madre. Por ejemplo, las células madre placentarias pueden inyectarse en un órgano dañado, y para la neogénesis de órganos y reparación de daño *in vivo*. Dicho daño puede deberse a dichas afecciones y trastornos incluyendo, pero no limitado a, defectos óseos incluyendo lesiones que se producen por cáncer, fracturas, y afecciones de la médula espinal tratables, p. ej., con fusión espinal. Las células madre placentarias pueden inyectarse en el hueso dañado solas o pueden introducirse con un sustrato implantable como se describe en la presente memoria. Las poblaciones aisladas de células madre placentarias pueden usarse, en realizaciones específicas, para tratar enfermedades o afecciones específicas, incluyendo, pero no limitado a mieloma múltiple, cánceres incluyendo cáncer óseo, neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, cordoma, histiocitoma fibroso maligno del hueso, fibrosarcoma del hueso, cáncer metastásico, mieloma múltiple, y cualquier forma de cáncer metastásico caracterizada por metástasis óseas. Como reconocerá un experto en la técnica, el tratamiento de defectos óseos causados por cáncer no abatirá necesariamente el cáncer en sí mismo. El tratamiento de defectos óseos según se proporciona en la presente memoria puede ocurrir antes, después o concurrentemente con terapias adicionales para el cáncer. De acuerdo con esto, en una realización, los defectos óseos se tratan antes de que se trate el cáncer con una terapia anticancerosa. En otra realización, los defectos óseos se tratan en el mismo momento o cerca del mismo en el que el cáncer se trata con una terapia anticancerosa. En otra realización, los defectos óseos se tratan después de que el cáncer se trata con una terapia anticancerosa.

También pueden usarse el perfusado placentario aislado, células de perfusado placentario, y/o poblaciones aisladas de células madre placentarias para tratar fracturas óseas, p. ej., fracturas óseas no de unión. Las poblaciones aisladas de células madre placentarias también pueden usarse para fusionar vértebras entre sí con el fin de, p. ej., completar una fusión espinal en un sujeto que lo necesita. Las poblaciones aisladas de células madre placentarias, en combinación con poblaciones de células madre o progenitoras, también pueden usarse para tratar lo anterior.

En determinados ejemplos de los métodos anteriores para tratar defectos óseos, pueden administrarse perfusado placentario, células de perfusado placentario y/o células madre placentarias, p. ej., células madre placentarias adherentes o no adherentes, a un individuo que tiene un defecto óseo. Puede administrarse a dicho individuo, p. ej., perfusado placentario según se obtiene de una placenta; perfusado placentario que se ha tratado para eliminar uno o más tipos celulares, p. ej., eritrocitos; células de perfusado placentario aisladas de perfusado placentario, o combinaciones de cualquiera de los anteriores. Dichas combinaciones también pueden comprender células madre placentarias adherentes aisladas y/o células madre placentarias no adherentes aisladas, como se describe en otro lugar en la presente memoria. Las combinaciones de perfusado placentario, células de perfusado placentario aisladas y/o células madre placentarias útiles para tratar un defecto óseo, o a un individuo que tiene un defecto óseo, se describen en la Sección 5.4, anteriormente.

En ejemplos específicos del método de tratamiento, las células placentarias están contenidas en perfusado placentario completo (no procesado). En otro ejemplo específico, las células placentarias son células de perfusado placentario. En otro ejemplo específico, las células placentarias son células madre placentarias. En determinados ejemplos más

específicos, las células madre no son adherentes. En determinados ejemplos, las células madre son $CD34^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD44^-$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 90 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados otros ejemplos del método, las células madre placentarias son adherentes. En ejemplos específicos, las células madre placentarias adherentes son $CD200^+$ y HLA-G^+; $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$; $CD200^+$ y OCT-4^+; $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+; $CD73^+$ y $CD105^+$ y facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de un cuerpo semejante a embrioide; u OCT-4^+ y facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende la célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides; o cualquier combinación de los mismos. En ejemplos más específicos de las células madre placentarias no adherentes, la célula madre $CD200^+$, HLA-G^+ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ y $CD105^+$; la célula madre $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, y HLA-G^+; la célula madre $CD200^+$, OCT-4^+ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+; la célula madre aislada de la reivindicación 1, en donde dicha célula madre $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+ es $CD34^-$, $CD45^-$, OCT-4^+ y $CD200^+$; la célula madre $CD73^+$ y $CD105^+$ aislada que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $OCT4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$; y/o la OCT-4^+ aislada y que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, y $CD45^-$. En determinados ejemplos, la población de las células madre placentarias ha sido expandida.

Cuando el perfusado placentario, células de perfusado placentario, o células madre placentarias se administran como una suspensión o líquido inyectable, las células pueden administrarse intravenosamente, o, preferiblemente, en el sitio del defecto óseo, p. ej., rotura.

En la presente memoria también se proporciona una composición para uso en la invención para uso en un método para tratar defectos óseos en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición implantable o inyectable que comprende una células madre placentarias $CD200^+$ adherentes proporcionadas en la presente memoria, tratando de esta manera el defecto óseo en el sujeto. En determinadas realizaciones, el defecto óseo es una lesión osteolítica asociada con un cáncer, una fractura ósea, o una médula espinal, p. ej., que necesita fusión. En determinadas realizaciones, la lesión osteolítica está asociada con mieloma múltiple, cáncer óseo, o cáncer metastásico. En determinadas realizaciones, la fractura ósea es una fractura no de unión. En determinadas realizaciones, se administra al sujeto una composición implantable que comprende una población de células madre no adherentes. En determinadas realizaciones, se implanta quirúrgicamente una composición implantable, p. ej., en el sitio del defecto óseo. En determinadas realizaciones, se administra al sujeto una composición inyectable que comprende una población de células madre no adherentes. En determinadas realizaciones, se administra quirúrgicamente una composición inyectable en la región del defecto óseo. En determinadas realizaciones, la composición inyectable se administra sistémicamente.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para formular una composición inyectable, que comprende combinar una población de células placentarias con ácido hialurónico o colágeno inyectable. En un ejemplo específico, las células placentarias están contenidas en perfusado placentario completo (no procesado). En otro ejemplo específico, las células placentarias son células de perfusado placentario. En otro ejemplo específico, las células placentarias son células madre placentarias. En determinados ejemplos más específicos, las células madre no son adherentes. En determinados ejemplos, las células madre son $CD34^+$. En determinados ejemplos, las células madre son $CD44^-$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, o $CD166^+$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, y $CD166^+$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, o $CD200^+$. En determinados ejemplos, dichas células madre son $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, y $CD200^+$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 70 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados ejemplos, al menos aproximadamente el 90 % de dichas células son células madre $CD34^+$ y $CD44^-$. En determinados otros ejemplos del método, las células madre placentarias son adherentes. En realizaciones específicas, las células madre placentarias adherentes son $CD200^+$ y HLA-G^+; $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$; $CD200^+$ y OCT-4^+; $CD200^+$, $CD73^+$, $CD105^+$ y HLA-G^+; y facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de un cuerpo semejante a embrioide; o $CD200^+$ y OCT-4^+ y facilitan la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides en una población de células placentarias que comprende la célula madre cuando dicha población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos semejantes a embrioides; o cualquier combinación de los mismos. En ejemplos más específicos de las células madre placentarias no adherentes, la célula

madre $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ y $CD105^+$; la célula madre $CD73^+$, $CD105^+$, y $CD200^+$ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, y $HLA\text{-}G^+$; la célula madre $CD200^+$, $OCT\text{-}4^+$ aislada es $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ y $HLA\text{-}G^+$; la célula madre aislada de la reivindicación 1 , en donde dicha célula madre $CD73^+$, $CD105^+$ y $HLA\text{-}G^+$ es CD34-, $CD45^-$, $OCT\text{-}4^+$ y $CD200^+$; la célula madre $CD73^+$ y $CD105^+$ aislada que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $OCT4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ y $CD45^-$; y/o la $OCT\text{-}4^+$ aislada y que facilita la formación de uno o más cuerpos semejantes a embrioides es $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, y $CD45^-$. En determinadas realizaciones, la población de las células madre placentarias ha sido expandida. En determinadas realizaciones, dicha composición comprende ácido hialurónico inyectable. En determinadas realizaciones, la composición comprende colágeno inyectable. En la presente memoria también se describen composiciones que comprenden una población de células madre no adherentes y ácido hialurónico o colágeno inyectable.

Las células madre placentarias pueden administrarse sin haber sido cultivadas en condiciones que causan la diferenciación de las células madre. Alternativamente, las células madre pueden cultivarse, p. ej., en medio osteogénico, p. ej., durante aproximadamente 1-20 días, antes de la administración. Alternativamente, las células madre placentarias pueden aislarse y sembrarse en una matriz, después cultivarse en medio osteogénico, p. ej., durante aproximadamente 1 -20 días. En otra realización, las células madre placentarias pueden cultivarse, p. ej., en medio osteogénico, p. ej., durante aproximadamente 1-20 días, después sembrarse en una matriz, después cultivarse en medio osteogénico como se describe en la presente memoria, p. ej., durante aproximadamente 1-20 días.

En otros ejemplos, las poblaciones aisladas de células madre placentarias pueden usarse en terapias o protocolos de regeneración o reemplazo de tejido autólogo o heterólogo, incluyendo, pero no limitado al tratamiento de defectos en el epitelio córneo, reparación de cartílago, dermoabrasión facial, membranas mucosales, membranas timpánicas, revestimientos intestinales, estructuras neurológicas (p. ej., retina, neuronas auditivas en la membrana basilar, neuronas olfativas en el epitelio olfativo), reparación de quemaduras y heridas para lesiones traumáticas de la piel, o para la reconstrucción de otros órganos o tejidos dañados o enfermos.

En determinados casos, una población aislada de células madre placentarias se usa en la reconstitución hematopoyética en un individuo que ha padecido una pérdida parcial o total de células madre hematopoyéticas, p. ej., individuos expuestos a dosis letales o subletales de radiación (ya sea industrial, médica o militar); individuos que han sido sometidos a mieloablación como parte, p. ej., de terapia para el cáncer, y semejantes. Las poblaciones aisladas de células madre derivadas de placenta pueden usarse en lugar de, o para suplementar, la médula ósea o poblaciones de las células madre derivadas de la médula ósea. Típicamente, aproximadamente 1×10^8 a 2×10^8 células mononucleares de médula ósea por kilogramo del peso del paciente se infunden para injerto en un trasplante de médula ósea (es decir, aproximadamente 70 ml de médula para un donante de 70 kg). Para obtener 70 ml se requiere una donación intensiva y la pérdida significativa de sangre del donante en el proceso de donación. Una población aislada de células madre placentarias para reconstitución hematopoyética puede comprender, en varias realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} o más células madre placentarias.

Las células madre placentarias descritas en la presente memoria, solas o en combinación con otras poblaciones de células madre o células progenitoras, pueden usarse en la fabricación de un tejido u órgano *in vivo*. Los métodos descritos en la presente memoria engloban el uso de células obtenidas de la placenta, p. ej., células madre o células progenitoras, para sembrar una matriz y cultivarlas bajo condiciones apropiadas para permitir que las células se diferencien y pueblen la matriz. Los tejidos y órganos obtenidos por los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para una variedad de propósitos, incluyendo propósitos de investigación y terapéuticos

Preferiblemente, las células madre placentarias adherentes como se proporcionan en la presente memoria, y las poblaciones de dichas células madre, pueden usarse para trasplantes autólogos y alogénicos, incluyendo trasplantes hematopoyéticos con tipo de HLA concordante y no concordante. En un ejemplo del uso de las células madre placentarias como trasplantes hematopoyéticos alogénicos, el huésped se trata para reducir el rechazo inmunológico de las células del donante, o para crear inmunotolerancia (véanse, p. ej., las Patentes U.S. Nos. 5 800 539 y 5 806 529). En otro ejemplo, el huésped no se trata para reducir el rechazo inmunológico o para crear inmunotolerancia.

Las células madre placentarias, bien solas o en combinación con una o más otras poblaciones de células madre, pueden usarse en protocolos de trasplante terapéutico, p. ej., para aumentar o reemplazar células madre o progenitoras del hígado, páncreas, riñón, pulmón, sistema nervioso, sistema muscular, hueso, médula ósea, timo, bazo, tejido mucosal, gónadas, o pelo. Adicionalmente, las células madre placentarias pueden usarse en lugar de clases específicas de células progenitoras (p. ej., condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células parenquimales pancreáticas, neuroblastos, células progenitoras musculares, etc.) en protocolos terapéuticos o de investigación en los que se usarían típicamente células progenitoras.

Las células madre placentarias como se describen en la presente memoria, y las poblaciones de las mismas, pueden usarse para el aumento, reparación o reemplazo de cartílago, tendón, o ligamentos. Por ejemplo, las prótesis (p. ej.,

prótesis de cadera) pueden recubrirse con construcciones de tejido de cartílago de reemplazo crecidas a partir de células madre placentarias descritas en la presente memoria. En otros ejemplos, las articulaciones (p. ej., rodilla) pueden reconstruirse con construcciones de tejido de cartílago crecidas a partir de células madre placentarias. Las construcciones de tejido de cartílago también pueden emplearse en cirugía reconstructiva mayor para diferentes tipos de articulaciones (véase, p. ej., Resnick y Niwayama, eds., 1988, Diagnosis of Bone and Joint Disorders, 2ª ed., W. B. Saunders Co.).

Las células madre placentarias adherentes descritas en la presente memoria pueden usarse para reparar el daño en tejidos y órganos producido por, p. ej., trauma, trastornos metabólicos, o enfermedad. En dicha realización, pueden administrarse a un paciente células madre placentarias, solas o combinadas con otras poblaciones de células madre o progenitoras, para regenerar o restaurar tejidos u órganos que han sido dañados como consecuencia de una enfermedad.

4.8.2 Composiciones que comprenden células madre placentarias

En la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden células madre placentarias $CD200^+$ adherentes, o biomoléculas de ellas, para uso en el tratamiento de defectos óseos o para uso en la fabricación de medicamentos para dichos tratamientos. Las células madre placentarias adherentes proporcionadas en la presente memoria pueden combinarse con cualquier compuesto, composición o dispositivo fisiológicamente aceptable o médicamente aceptable, para uso, p. ej., en investigación o terapia.

4.8.2.1 Células madre placentarias criopreservadas

Las poblaciones de células madre placentarias para uso en la invención pueden preservarse, por ejemplo, criopreservarse para un uso posterior. Los métodos para la criopreservación de células, tales como células madre, son muy conocidos en la técnica. Las poblaciones de células madre placentarias para uso en la invención pueden prepararse en una forma que es fácilmente administrable a un individuo. Por ejemplo, en la presente memoria se proporciona una población de células madre placentarias para uso en la invención que está contenida en un contenedor que es adecuado para el uso médico. Dicho contenedor puede ser, por ejemplo, una bolsa de plástico estéril, matraz, frasco, u otro contenedor a partir del que pueda dispensarse fácilmente la población de células madre placentarias. Por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de sangre u otro plástico, bolsa médicamente aceptable adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El contenedor es preferiblemente uno que permite la criopreservación de la población de células madre combinada.

La población de células madre placentarias criopreservadas puede comprender células madre placentarias derivadas de un único donante, o de múltiples donantes. La población de células madre placentarias puede ser completamente concordante en HLA con un receptor pretendido, o parcialmente o completamente no concordante en HLA.

Así, en una realización, en la presente memoria se proporciona una composición para uso en la invención que comprende una población de células madre $CD200^+$ adherentes en un contenedor. En una realización específica, la población de células madre se criopreserva. En otra realización específica, el contenedor es una bolsa, matraz, o frasco. En una realización más específica, dicha bolsa en una bolsa de plástico estéril. En una realización más específica, dicha bolsa es adecuada para, permite o facilita la administración intravenosa de dicha población de células madre placentarias. La bolsa puede comprender múltiples lúmenes o compartimentos que están interconectados para permitir el mezclado de las células madre placentarias y una o más otras disoluciones, p. ej., un fármaco, antes de, o durante, la administración. En otra realización específica, la composición comprende uno o más compuestos que facilitan la criopreservación de la población de células madre combinada. En otra realización específica, dicha población de células madre placentarias está contenida en una disolución acuosa fisiológicamente aceptable. En una realización más específica, dicha disolución acuosa fisiológicamente aceptable es una disolución de NaCl al 0.9 %. En otra realización específica, dicha población de células madre placentarias comprende células placentarias que son concordantes en HLA con un receptor de dicha población de células madre. En otra realización específica, dicha población de células madre combinada comprende células placentarias que son al menos parcialmente no concordantes en HLA con un receptor de dicha población de células madre. En otra realización específica, dichas células madre placentarias derivan de una pluralidad de donantes.

4.8.2.2 Composiciones farmacéuticas

Las poblaciones de células madre placentarias para uso en la invención, o poblaciones de células que comprenden células madre placentarias, pueden formularse en composiciones farmacéuticas para uso *in vivo*. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden una población de células madre placentarias, o una población de células que comprende células madre placentarias, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, p. ej., una disolución salina u otra disolución fisiológicamente aceptable aceptada para la administración *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender las poblaciones de células madre placentarias para uso en la invención, o tipos de células madre placentarias, descritos en otro lugar en la presente memoria. Las

composiciones farmacéuticas pueden comprender células madre placentarias fetales, maternas, o tanto fetales como maternas. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender además células madre placentarias para uso en la invención obtenidas de un único individuo o placenta, o de una pluralidad de individuos o placentas.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender cualquier número de células madre placentarias para uso en la invención. Por ejemplo, una dosis unitaria de dichas células madre placentarias puede comprender, en varias realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} o más células madre placentarias.

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

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender uno o más compuestos que, p. ej., facilitan el injerto (p. ej., anticuerpos antireceptor de células T, un inmunosupresor, o semejantes); estabilizantes tales como albúmina, dextrano 40, gelatina, hidroxietil almidón, y semejantes.

4.8.2.3 Medio condicionado de células madre placentarias

Las células madre placentarias para uso en la invención pueden usarse para producir medio condicionado, esto es, medio que comprende una o más biomoléculas secretadas o excretadas por las células madre. En varias realizaciones, el medio condicionado comprende medio en el que dichas células madre placentarias han crecido durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días. En otras realizaciones, el medio condicionado comprende medio en el que dichas células madre placentarias han crecido hasta al menos aproximadamente el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % de confluencia, o hasta el 100 % de confluencia. Dicho medio condicionado puede usarse para apoyar el cultivo de una población separada de células madre placentarias, o células madre de otra clase. En otro ejemplo, el medio condicionado comprende medio en el que las células madre placentarias se han diferenciado en un tipo celular adulto. En otro ejemplo, el medio condicionado descrito en la presente memoria comprende medio en el que se han cultivado las células madre placentarias y células madre no placentarias.

4.8.2.4 Matrices que comprenden células madre placentarias

En la presente memoria se proporcionan además matrices, hidrogeles, soportes, y semejantes que comprenden células madre placentarias $CD200^+$ adherentes, o una población de dichas células madre placentarias. En determinadas realizaciones, la matriz puede ser cualquier sustrato conocido que un experto en la técnica sabe que es útil para tratar defectos óseos. Por ejemplo, la matriz puede ser un sustrato de β-fosfato tricálcico, un sustrato de β-fosfato tricálcico-colágeno, un sustrato de colágeno, un sustrato de fosfato de calcio, un sustrato de colágeno mineralizado, y un sustrato de ácido hialurónico. En algunas realizaciones, el colágeno en la matriz puede ser colágeno placentario. Los métodos y composiciones para aislar y preparar colágeno placentario están descritos extensamente, por ejemplo, en la Solicitud de Patente U.S. No. 11/450 934, presentada el 9 de junio, 2006.

Dichas células madre placentarias pueden sembrarse en la matriz para tratar hueso antes de o después de una etapa de diferenciación. Por ejemplo, las células madre placentarias pueden cultivarse, p. ej., en medio osteogénico durante, p. ej., aproximadamente 1-20 días, después sembrarse en la matriz. Alternativamente, las células madre placentarias pueden aislarse y sembrarse en la matriz, después cultivarse en medio osteogénico como se describe en la presente memoria durante, p. ej., aproximadamente 1-20 días. En otra realización, las células madre placentarias se cultivan, p. ej., en medio osteogénico durante, p. ej., aproximadamente 1-20 días, después se siembran en la matriz, después se cultivan en medio osteogénico como se describe en la presente memoria durante, p. ej., aproximadamente 1-20 días.

Dichas células madre placentarias pueden sembrarse en una matriz natural, p. ej., un biomaterial placentario tal como un material de membrana amniótica. Dicho material de membrana amniótica puede ser, p. ej., membrana amniótica diseccionada directamente de una placenta de mamífero; membrana amniótica fijada o tratada con calor, membrana amniótica sustancialmente seca {es decir, <20 % de H_2O), membrana coriónica, membrana coriónica sustancialmente seca, membrana amniótica y coriónica sustancialmente seca, y semejantes. Los biomateriales placentarios preferidos sobre los que pueden sembrarse las células madre placentarias se describen en Hariri, Publicación de Solicitud U.S. No. 2004/0048796.

Dichas células madre placentarias pueden suspenderse en una disolución de hidrogel adecuada, p. ej., para inyección. Los hidrogeles adecuados para dichas composiciones incluyen péptidos con auto-ensamblaje, tales como RAD16. En

una realización, puede dejarse que una disolución de hidrogel que comprende las células se endurezca, por ejemplo, en un molde, para formar una matriz que tiene células dispersadas en ella para implante. Las células madre placentarias en dicha matriz también pueden cultivarse de manera que las células se expanden mitóticamente antes del implante. El hidrogel es, p. ej., un polímero orgánico (natural o sintético) que está entrecruzado mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura de red abierta tridimensional que atrapa las moléculas de agua para formar un gel. Los materiales formadores de hidrogeles incluyen polisacáridos tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazinas, y poliacrilatos, que se entrecruzan iónicamente, o polímeros en bloque tales como copolímeros en bloque de óxido de polietileno-polipropilen glicol que se entrecruzan por temperatura o pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o matriz es biodegradable.

En algunas realizaciones, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ* (véase., p. ej., la Publicación de Solicitud de Patente U.S. 2002/0022676; Anseth *et al*, *J. Control Release*, 78(1-3): 199-209 (2002); Wang *et al.*, *Biomaterials*, 24(22):3969-80 (2003).

En algunas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en disoluciones acuosas, tales como agua, disoluciones salinas tamponadas, o disoluciones alcohólicas acuosas, que tienen grupos laterales polares, o una sal iónica monovalente de las mismas. Los ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que pueden reaccionar con cationes son poli(fosfazenos), 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 pueden usarse los copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por la reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de éter de vinilo. Los ejemplos de grupos ácidos son grupos ácido carboxílico, grupos ácido sulfónico, grupos alcoholes halogenados (preferiblemente, fluorados), grupos OH fenólicos, y grupos OH ácidos.

Dichas células madre placentarias o cocultivos de las mismas pueden sembrarse en un marco o soporte tridimensional e implantarse *in vivo*. Dicho marco puede implantarse en combinación con uno cualquiera o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que estimulan la formación de tejido o aumentan o mejoran de otra forma la reparación de tejidos.

Los ejemplos de soportes que pueden usarse incluyen mallas no tejidas, espumas porosas, o péptidos con auto-ensamblaje. Las mallas no tejidas pueden formarse usando fibras comprendidas por un copolímero sintético absorbible de ácidos glicólico y láctico (p. ej., PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N. J.). Las espumas, compuestas por, p. ej., copolímero poli(ε-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos tales como secado por congelación, o liofilización (véase, p. ej., la Pat. U.S. No. 6 355 699), también pueden usarse como soportes.

Dichas células madre placentarias también pueden sembrarse en, o ponerse en contacto con, un material cerámico fisiológicamente aceptable incluyendo, pero no limitado a, fosfato de mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri-, y tetra-calcio, hidroxiapatito, fluoroapatitos, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de magnesio y calcio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS®, y mezclas de los mismos. Los materiales cerámicos porosos biocompatibles actualmente disponibles comercialmente incluyen SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canadá), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Suiza), y productos de injerto de hueso de colágeno mineralizado tales como HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITOSS®, RHAKOSS™, y CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). El marco puede ser una mezcla, combinación o amalgama de materiales naturales y/o sintéticos.

En otra realización, dichas células madre placentarias pueden sembrarse en, o ponerse en contacto con, un fieltro, que puede estar compuesto, p. ej., por un hilado multifilamento hecho de un material bioabsorbible tal como copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL, o ácido hialurónico.

Las células madre placentarias para uso en la invención pueden, en otra realización, sembrarse en soportes de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Dichos soportes de espuma pueden moldearse en una forma útil, tal como la de una parte de una estructura específica en el cuerpo que se va a reparar, reemplazar o aumentar. En algunas realizaciones, el marco 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 madre placentarias con el fin de potenciar la adherencia de las células. Las superficies externas de una matriz pueden modificarse para mejorar la adherencia o crecimiento de las células y la diferenciación de tejido, tal como recubriendo con plasma la matriz, o la adición de una o más proteínas (p. ej., colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (p. ej., heparin sulfato, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, dermatán sulfato, queratin sulfato, etc.), una matriz celular, y/o otros materiales tales como, pero no limitado a, gelatina, alginatos, agar, agarosa, y gomas de plantas, y semejantes.

En algunas realizaciones, el soporte comprende, o se trata con, materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y sostener el crecimiento endotelial, la migración, y deposición de matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no están limitados a, materiales

naturales tales como proteínas de la membrana de basamento tales como laminina y colágeno Tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE, y siliconas de poliuretanourea segmentada, tales como PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). El soporte también puede comprender agentes antitrombóticos tales como heparina; los soportes también pueden tratarse para alterar la carga superficial (p. ej., recubrimiento con plasma) antes de sembrarlo con células madre placentarias. El soporte puede comprender además agentes que estimulan el crecimiento óseo y/o inhiben la resorción ósea. Por ejemplo, el soporte puede comprender proteínas morfogénicas óseas, p. ej., BMP-2 y/o BMP-7, inhibidores de WNT, y semejantes.

4.8.3 Líneas inmortalizadas de células madre placentarias

Las células placentarias de mamífero pueden inmortalizarse condicionalmente por transfección con cualquier vector adecuado que contenga un gen promotor del crecimiento, esto es, un gen que codifica una proteína que, bajo las condiciones apropiadas, promueve el crecimiento de la célula transfectada, de manera que la producción y/o actividad de la proteína promotora del crecimiento se puede regular por un factor externo. Como un ejemplo, el gen promotor del crecimiento es un oncogén tal como, pero no limitado a, v-myc, N-myc, c-myc, p53, antígeno T grande de SV40, antígeno T grande de polioma, adenovirus E1a o proteína E7 del papilomavirus humano.

La regulación externa de la proteína promotora del crecimiento puede conseguirse poniendo el gen promotor del crecimiento bajo el control de un promotor que se puede regular externamente, p. ej., un promotor cuya actividad puede controlarse, por ejemplo, modificando la temperatura de las células transfectadas o la composición del medio en contacto con las células. Por ejemplo, puede emplearse un sistema de expresión génica controlado por la tetraciclina (tet) (véase Gossen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551, 1992; Hoshimaru *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1518-1523, 1996). En ausencia de tet, un transactivador controlado por tet (tTA) en este vector activa fuertemente la transcripción a partir de ph_{CMV*-1}, un promotor mínimo del citomegalovirus humano fusionado a las secuencias operadoras de tet. tTA es una proteína de fusión del represor (tetR) del operón de resistencia de tet derivado del transposón-10 de *Escherichia coli* y el dominio ácido de VP16 del virus del herpes simple. Las concentraciones bajas, no tóxicas de tet (p. ej., 0.01-1.0 µg/mL) suprimen casi completamente la transactivación por tTA.

En un ejemplo, el vector contiene además un gen que codifica un marcador seleccionable, p. ej., una proteína que confiere resistencia a fármacos. El gen de resistencia a neomicina bacteriano (neo^R) es uno de dichos marcadores que puede emplearse como se describe en la presente memoria. Las células que portan neo^R pueden seleccionarse por medios conocidos para los expertos en la técnica, tales como la adición, p. ej., de 100-200 µg/mL de G418 al medio de crecimiento.

La transfección puede conseguirse por cualquiera de una variedad de medios conocidos para los expertos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, infección retroviral. En general, un cultivo celular puede transfectarse por incubación con una mezcla de medio condicionado recogido de la línea celular productora para el vector y DMEM/F12 que contiene suplementos de N_2. Por ejemplo, un cultivo de células placentarias preparado como se ha descrito anteriormente puede infectarse después, p. ej., cinco días *in vitro* por incubación durante aproximadamente 20 horas en un volumen de medio condicionado y dos volúmenes de DMEM/F12 que contiene suplementos de N_2. Las células transfectadas que portan un marcador seleccionable pueden seleccionarse entonces como se ha escrito anteriormente.

Después de la transfección, los cultivos se subcultivan en una superficie que permite la proliferación, p. ej., que permite que al menos aproximadamente el 30 % de las células se duplique en un periodo de 24 horas. Preferiblemente, el sustrato es un sustrato de poliornitina/laminina, que consiste en plástico de cultivo tisular recubierto con poliornitina (10 µg/mL) y/o laminina (10 µg/mL), un sustrato de polilisina/laminina o una superficie tratada con fibronectina. Los cultivos se alimentan entonces cada 3-4 días con medio de crecimiento, que puede estar o no suplementado con uno o más factores que aumentan la proliferación. Los factores que aumentan la proliferación pueden añadirse al medio de crecimiento cuando los cultivos tienen una confluencia menor del 50 %.

Las líneas inmortalizadas condicionalmente de células madre placentarias pueden subcultivarse usando técnicas estándar, tales como por tripsinización, cuando tienen una confluencia del 80-95 %. Hasta aproximadamente el vigésimo subcultivo, es beneficioso mantener la selección (por ejemplo, por la adición de G418 para células que contienen un gen de resistencia a neomicina). Las células también pueden congelarse en nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo.

Las líneas celulares clonales pueden aislarse a partir de una línea inmortalizada condicionalmente de células madre placentarias humanas preparada como se ha descrito anteriormente. En general, dichas líneas celulares clonales pueden aislarse usando técnicas estándar, tal como dilución limitante o usando anillos de clonación, y expandirse. Las líneas celulares clonales pueden alimentarse y subcultivarse generalmente como se ha descrito anteriormente.

Las líneas inmortalizadas condicionalmente de células madre placentarias humanas, que pueden ser, pero no es necesario que sean, clonales pueden inducirse generalmente para que se diferencien suprimiendo la producción y/o actividad de la proteína promotora del crecimiento bajo condiciones de cultivo que facilitan la diferenciación. Por ejemplo, si el gen que codifica la proteína promotora del crecimiento está bajo el control de un promotor que se puede regular externamente, las condiciones, p. ej., temperatura o composición del medio, pueden modificarse para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. Para el sistema de expresión génica controlado por la tetraciclina discutido anteriormente, la diferenciación puede conseguirse por la adición de tetraciclina para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. En general, es suficiente 1 µg/mL de tetraciclina durante 4-5 días para iniciar la diferenciación. Para promover una diferenciación adicional, pueden incluirse agentes adicionales en el medio de crecimiento.

4.8.4 Ensayos

Las células madre placentarias para uso en la invención pueden usarse en ensayos para determinar la influencia de las condiciones del cultivo, factores ambientales, moléculas (p. ej., biomoléculas, moléculas inorgánicas pequeñas, etc.) y semejantes sobre la proliferación, expansión, y/o diferenciación de las células madre, comparado con células madre placentarias no expuestas a dichas condiciones.

En una realización preferida, las células madre placentarias para uso en la invención se ensayan para detectar cambios en la proliferación, expansión o diferenciación después del contacto con una molécula. Por ejemplo, la diferenciación osteogénica puede ensayarse monitorizando la actividad fosfatasa alcalina y/o la mineralización del calcio.

En un ejemplo, en la presente memoria se describe un método para identificar un compuesto que modula la proliferación de una pluralidad de células madre placentarias, que comprende poner en contacto dicha pluralidad de células madre con dicho compuesto bajo condiciones que permitan la proliferación, en donde si dicho compuesto causa un cambio detectable en la proliferación de dicha pluralidad de células madre comparado con una pluralidad de células madre que no se han puesto en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto se identifica como un compuesto que modula la proliferación de las células madre placentarias. En un ejemplo específico, dicho compuesto se identifica como un inhibidor de la proliferación. En otro ejemplo, dicho compuesto se identifica como un potenciador de la proliferación.

En la presente memoria se describe además un método para identificar un compuesto que modula la expansión de una pluralidad de células madre placentarias, que comprende poner en contacto dicha pluralidad de células madre con dicho compuesto bajo condiciones que permitan la expansión, en donde si dicho compuesto causa un cambio detectable en la expansión de dicha pluralidad de células madre comparado con una pluralidad de células madre que no se han puesto en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto se identifica como un compuesto que modula la expansión de las células madre placentarias. En un ejemplo específico, dicho compuesto se identifica como un inhibidor de la expansión. En otro ejemplo, dicho compuesto se identifica como un potenciador de la expansión.

En la presente memoria se describe un método para identificar un compuesto que modula la diferenciación de una célula madre placentaria, que comprende poner en contacto dichas células madre con dicho compuesto bajo condiciones que permitan diferenciación, en donde si dicho compuesto causa un cambio detectable en la diferenciación de dichas células madre comparado con una célula madre que no se ha puesto en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto se identifica como un compuesto que modula la proliferación de las células madre placentarias. En un ejemplo específico, dicho compuesto se identifica como un inhibidor de la diferenciación. En otro ejemplo, dicho compuesto se identifica como un potenciador de la diferenciación.

5. Ejemplos

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren las presentes realizaciones y no deben considerarse como limitantes de ninguna forma.

5.1 Ejemplo 1: cultivo de las células madre placentarias

Las células madre placentarias se obtienen a partir de una placenta de mamífero después del parto bien por perfusión o por disrupción física, p. ej., digestión enzimática. Las células se cultivan en un medio de cultivo que comprende 60 % de DMEM-LG (Gibco), 40 % de MCDB-201 (Sigma), 2 % de suero fetal de ternera (FCS) (Hyclone Laboratories), 1x insulina-transferrina-selenio (ITS), 1x ácido lenolénico-albúmina de suero bovino (LA-BSA), dexametasona 10^{-9} M (Sigma), ácido ascórbico 2-fosfato 10^{-4} M (Sigma), 10ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (R&D Systems), 10ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (R&D Systems), y 100U de penicilina/1000U de estreptomicina.

El matraz de cultivo en el que se cultivan las células se prepara como sigue. Se recubren matraces T75 con fibronectina (FN), mediante la adición de 5 ml de PBS que contiene 5ng/ml de FN humana (Sigma F0895) al matraz. Los matraces

con disolución de FN se dejan a 37 ºC durante 30 min. La disolución de FN se retira entones antes del cultivo celular. No es necesario secar los matraces después del tratamiento. Alternativamente, los matraces se dejan en contacto con la disolución de FN a 4 ºC toda la noche o más; antes del cultivo, los matraces se calientan y se retira la disolución de FN.

Células madre placentarias aisladas por perfusión

Los cultivos de las células madre placentarias de perfusado placentario se establecen como sigue. Las células de un gradiente de Ficoll se siembran en matraces T75 recubiertos con FN, preparados como anteriormente, a 50- 100x 10^6 células/matraz en 15 ml de medio de cultivo. Típicamente, se siembran 5 a 10 matraces. Los matraces se incuban a 37 ºC durante 12-18 hr para permitir la adherencia de las células adherentes. Se añaden 10 ml de PBS caliente a cada matraz para retirar las células en suspensión, y se mezcla suavemente. Se retiran entonces 15 mL del medio y se reemplazan con 15 ml de medio de cultivo fresco. Todos el medio se cambia 3-4 días después del inicio del cultivo. Se realizan cambios posteriores del medio de cultivo, durante los cuales el 50 % o 7.5 ml del medio se retira.

Empezando aproximadamente en el día 12, el cultivo se chequea en el microscopio para examinar el crecimiento de las colonias de células adherentes. Cuando los cultivos celulares tienen una confluencia de aproximadamente el 80 %, típicamente entre el día 13 al día 18 después del inicio del cultivo, se recogen las células adherentes por digestión con tripsina. Las células recogidas de estos cultivos primarios se designan subcultivo 0 (cero).

Células madre placentarias aisladas por disrupción física y digestión enzimática

Los cultivos de células madre placentarias se establecen a partir de tejido placentario digerido como sigue. La placenta perfundida se pone en una hoja de papel estéril con el lado materno hacia arriba. Aproximadamente 0.5 cm de la capa de la superficie en el lado materno de la placenta se raspa con una cuchilla, y la cuchilla se usa para retirar un bloque de tejido placentario que mide aproximadamente 1 x 2 x 1 cm. Este tejido placentario se trocea entonces en trozos de aproximadamente 1mm^3. Estos trozos se recogen en un tubo Falcon de 50ml y se digieren con colagenasa IA (2mg/ml, Sigma) durante 30 minutos, seguido de tripsina-EDTA (0.25 %, GIBCO BRL) durante 10 minutos, a 37 ºC en un baño de agua. La disolución resultante se centrifuga a 400g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y la disolución de digestión se retira. El sedimento se resuspende a aproximadamente 10 volúmenes con PBS (por ejemplo, un sedimento de 5 ml se resuspende con 45 ml de PBS), y los tubos se centrifugan a 400g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de tejido/células se resuspende en 130 mL de medio de cultivo, y las células se siembran a 13ml por matraz T-75 recubierto con fibronectina. Las células se incuban a 37 ºC con una atmósfera humidificada con 5 % de CO_2. Las células madre placentarias se criopreservan opcionalmente en este estadio.

Subcultivo y expansión de las células madre placentarias

Las células criopreservadas se descongelan rápidamente en un baño de agua a 37 ºC. Las células madre placentarias se retiran inmediatamente del criovial con 10ml de medio caliente y se transfieren a un tubo estéril de 15ml. Las células se centrifugan a 400g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se resuspenden suavemente en 10ml de medio de cultivo caliente pipeteando, y los recuentos de células viables se determinan por exclusión de azul de Tripán. Las células se siembran entonces a aproximadamente 6000-7000 células por cm^2 en matraces recubiertos con FN, preparados como anteriormente (aproximadamente $5x10^5$ células por matraz T-75). Las células se incuban a 37 ºC, 5 % de CO_2 y 90 % de humedad. Cuando las células alcanzaron el 75-85 % de confluencia, todo el medio gastado se retira asépticamente de los matraces y se desecha. Se añaden 3ml de disolución de 0.25 % de tripsina/EDTA (p/v) para cubrir la capa celular, y las células se incuban a 37 ºC, 5 % de CO_2 y 90 % de humedad durante 5 minutos. El matraz se golpea suavemente una vez o dos veces para acelerar el despegue de las células. Una vez el >95 % de las células son redondas y están despegadas, se añaden 7ml de medio de cultivo templado a cada matraz T-75, y la disolución se dispersa pipeteando sobre la superficie de la capa celular varias veces.

Después de contar las células y determinar su viabilidad como anteriormente, las células se centrifugan a 1000 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se subcultivan mediante la resuspensión suave del sedimento celular de un matraz T-75 con medio de cultivo, y sembrando las células uniformemente en dos matraces T-75 recubiertos con FN.

Usando los métodos anteriores, se identifican poblaciones de células madre placentarias adherentes que expresan los marcadores CD105, CD117, CD33, CD73, CD29, CD44, CD10, CD90 y CD133. Esta población de las células no expresaba CD34 o CD45. Algunos, pero no todos los cultivos de estas células madre placentarias, expresaban HLA-ABC y/o HLA-DR.

5.2 Ejemplo 2: aislamiento de las células madre placentarias de estructuras placentarias

5.2.1 Materiales y métodos

5.2.1.1 Aislamiento del fenotipo de interés

Se obtuvieron cinco poblaciones distintas de células placentarias a partir de las placentas de embarazos normales, a término. Todos los donantes proporcionaron un consentimiento escrito completo para el uso de sus placentas para propósitos de investigación. Se examinaron cinco poblaciones de células placentarias: (1) perfusado placentario (de la perfusión de la vasculatura placentaria); y digestiones enzimáticas de (2) amnios, (3) corion, (4) placa amnios-corion, y (5) cordón umbilical. Los distintos tejidos placentarios se limpiaron en PBS estéril (Gibco-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y se pusieron en placas Petri estériles separadas. Los distintos tejidos se trocearon usando un escalpelo quirúrgico estéril y se pusieron en tubos cónicos Falcon de 50 mL. Los tejidos troceados se digirieron con 1X Colagenasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 20 minutos en un baño de agua a 37 ºC, se centrifugaron, y se digirieron entonces con 0.25 % de Tripsina-EDTA (Gibco-Invitrogen Corp) durante 10 minutos en un baño de agua a 37 ºC. Los distintos tejidos se centrifugaron después de la digestión y se lavaron una vez con PBS estéril (Gibco-Invitrogen Corp). Las células reconstituidas se filtraron entonces dos veces, una vez con filtros celulares de 100 µm y una vez con filtros de separación de 30 µm, para eliminar cualquier matriz extracelular residual o restos celulares.

5.2.1.2 Evaluación de la viabilidad celular y recuentos celulares

Se empleó el método manual de la exclusión de azul de tripán después de la digestión para calcular los recuentos celulares y evaluar la viabilidad celular. Las células se mezclaron con tinción azul de tripán (Sigma-Aldrich) a una relación de 1:1, y las células se leyeron en un hemocitómetro.

5.2.1.3 Caracterización de los marcadores de la superficie celular

Las células que eran HLA $ABC^-/CD45^-/CD34^-/CD133^+$ se seleccionaron para su caracterización. Las células que tenían este fenotipo se identificaron, cuantificaron, y caracterizaron por dos citómetros de flujo Becton-Dickinson, el FACSCalibur y el FACS Aria (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.). Las distintas células placentarias se tiñeron, a una relación de aproximadamente 10 µL de anticuerpo por 1 millón de células, durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador. Se usaron los siguientes anticuerpos anti-humano: anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) frente a HLA-G (Serotec, Raleigh, NC), CD10 (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA), CD44 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), y CD 105 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN); anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (PE) frente a CD44, CD200, CD117, y CD13 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina-Cy5 (PE Cy5) y Estreptavidina frente a CD117 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina-Cy7 (PE Cy7) frente a CD33 y CD10 (BD Biosciences); anticuerpos monoclonales conjugados con aloficocianina (APC) y estreptavidina frente a CD38 (BD Biosciences Pharmingen); y CD90 biotinilada (BD Biosciences Pharmingen). Después de la incubación, las células se lavaron una vez para eliminar los anticuerpos no unidos y se fijaron toda la noche con 4 % de paraformaldehído (USB, Cleveland, OH) a 4 ºC. Al día siguiente, las células se lavaron dos veces, se filtraron a través de un filtro de separación de 30 µm, y se operaron en el o los citómetros de flujo.

Las muestras que se tiñeron con anticuerpos anti-IgG de ratón (BD Biosciences Pharmingen) se usaron como controles negativos y se usaron para ajustar los tubos del fotomultiplicador (PMT). Las muestras que se tiñeron solo con anticuerpos anti-humano se usaron como controles positivos y se usaron para ajustar las superposiciones/compensaciones espectrales.

5.2.1.4 Separación y cultivo de las células

Un conjunto de las células placentarias (de perfusado, amnios, o corion) se tiñó con 7-Amino-Actinomicina D (7AAD; BD Biosciences Pharmingen) y anticuerpos monoclonales específicos para el fenotipo de interés. Las células se tiñeron a una relación de 10 µL de anticuerpo por 1 millón de células, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador. Estas células se separaron entonces positivamente para células vivas que expresan el fenotipo de interés en el BD FACS Aria y se sembraron en placas en cultivo. Las poblaciones de células placentarias separadas (población de interés) y "Toda" (no separadas) se sembraron en placas para comparaciones. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos recubierta con fibronectina (Sigma-Aldrich) a las densidades celulares listadas en la Tabla 1 (células/cm^2). La densidad celular, y si el tipo celular se sembró en placas en duplicado o triplicado, estuvo determinado y gobernado por el número de las células que expresan el fenotipo de interés.

Tabla 1: Densidades de siembra en placas de las células

Cultivo en placas de 96 pocillos			
Densidad de las células sembradas en placas			
Condiciones	Separadas	Todas	Todas Densidad Máxima
Fuente de las células	A		
Conjunto nº 1:	40.6 K/cm^2	40.6 K/cm^2	93.8 K/cm^2
Conjunto nº 2	40.6 K/cm^2	40.6 K/cm^2	93.8 K/cm^2

Conjunto nº 3:	40.6 K/cm^2	40.6 K/cm^2	93.8 K/cm^2
Fuente de las células	B		
Conjunto nº 1:	6.3 K/cm^2	6.3 K/cm^2	62.5 K/cm^2
Conjunto nº 2	6.3 K/cm^2	6.3 K/cm^2	62.5 K/cm^2
Fuente de las células	C		
Conjunto nº 1:	6.3 K/cm^2	6.3 K/cm^2	62.5 K/cm^2
Conjunto nº 2	6.3 K/cm^2	6.3 K/cm^2	62.5 K/cm^2

Se añadió medio completo (60 % de DMEM-LG (Gibco) y 40 % de MCDB-201 (Sigma); 2 % de suero fetal de ternera (Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona 10^{-9} M (Sigma); ácido ascórbico 2-fosfato 10^{-4} M (Sigma); 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (R&D Systems); y 10 ng/mL de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (R&D Systems)) a cada pocillo de la placa de 96 pocillos y la placa se puso en un incubador con 5 % de CO_2/37 ºC. En el día 7, se añadieron 100 µL de medio completo a cada uno de los pocillos. La placa de 96 pocillos se monitorizó durante aproximadamente dos semanas y una evaluación final del cultivo se completó en el día 12.

5.2.1.5 Análisis de los datos

Los datos del FACSCalibur se analizaron en FlowJo (Tree star, Inc) usando técnicas estándar de selección de poblaciones. Los datos del BD FACS Aria se analizaron usando el software FACSDiva (Becton-Dickinson). Los datos del FACS Aria se analizaron usando una selección de poblaciones de discriminación en doblete para minimizar los dobletes, así como técnicas estándar de selección de poblaciones. Todos los resultados se compilaron en Microsoft Excel y todos los valores, en la presente memoria, se representan como promedio ± desviación estándar (número, error estándar de la media).

5.2.2 Resultados

5.2.2.1 Viabilidad celular

La viabilidad después de la digestión se evaluó usando el método manual de exclusión de azul de tripán (FIG 1). La viabilidad promedio de las células obtenida de la mayoría del tejido digerido (de amnios, corion o placa amnios-corion) fue alrededor del 70 %. El amnios tuvo una viabilidad promedio del 74.35 % ±10.31 % (n=6, SEM=4.21), el corion tuvo una viabilidad promedio del 78.18 % ± 12.65 % (n=4, SEM=6.32), la placa amnios-corion tuvo una viabilidad promedio del 69.05 % ±10.80 % (n=4, SEM=5.40), y el cordón umbilical tuvo una viabilidad promedio del 63.30 % ±20.13 % (n=4, SEM=10.06). Las células de la perfusión, que fueron sometidas a digestión, retuvieron la mayor viabilidad promedio, 89.98±6.39 % (n=5, SEM=2.86).

5.2.2.2 Cuantificación celular

Las cinco poblaciones distintas de células derivadas de placenta se analizaron para determinar los números de células HLA ABC$^-$/CD45$^-$/CD34$^-$/CD133$^+$. A partir del análisis de los datos del BD FACSCalibur, se observó que el amnios, perfusado, y corion contenían el mayor número total de estas células, 30.72 ± 21.80 células (n=4, SEM= 10.90), 26.92 ± 22.56 células (n=3, SEM=13.02), y 18.39 ± 6.44 células (n=2, SEM=4.55), respectivamente (datos no mostrados). La placa amnios-corion y el cordón umbilical contenían el menor número total de las células que expresan el fenotipo de interés, 4.72 ± 4.16 células (n=3, SEM=2.40) y 3.94 ± 2.58 células (n=3, SEM=1.49), respectivamente (datos no mostrados).

De forma similar, cuando se analizó el porcentaje de células totales que expresan el fenotipo de interés, se observó que el amnios y el perfusado placentario contenían los porcentajes más altos de las células que expresan este fenotipo (0.0319 % ± 0.0202 % (n=4, SEM=0.0101) y 0.0269 % ± 0.0226 % (n=3, SEM=0.0130), respectivamente (FIG. 2). Aunque el cordón umbilical contenía un pequeño número de las células que expresan el fenotipo de interés (FIG. 2), contenía el tercer porcentaje más alto de las células que expresan el fenotipo de interés, 0.020±0.0226 % (n=3, SEM=0.0131) (FIG. 2). El corion y la placa amnios-corion contenían los porcentajes más bajos de las células que expresan el fenotipo de interés, 0.0184±0.0064 % (n=2, SEM=0.0046) y 0.0177±0.0173 % (n=3, SEM=0.010), respectivamente (FIG. 2).

Consistente con los resultados del análisis del BD FACSCalibur, los datos del BD FACS Aria también identificaron el amnios, perfusado, y corion como los que proporcionan mayores números de células HLA ABC$^-$/CD45$^-$/CD34$^-$/CD133$^+$ que las fuentes restantes. El promedio del número total de las células que expresan el fenotipo de interés entre el amnios, perfusado, y corion fue 126.47 ± 55.61 células (n=15, SEM=14.36), 81.65 ± 34.64 células (n=20, SEM=7.75), y 51.47 ± 32.41 células (n=15, SEM=8.37), respectivamente (datos no mostrados). La placa amnios-corion y el cordón umbilical contenían el menor número total de las células que expresan el fenotipo de interés, 44.89 ± 37.43 células (n=9, SEM=12.48) y 11.00 ± 4.03 células (n=9, SEM=1.34), respectivamente (datos no mostrados).

Los datos del BD FACS Aria revelaron que las fuentes de células B y A contenían los porcentajes más altos de células HLA ABC$^-$/CD45$^-$/CD34$^-$/CD133$^+$, 0.1523 ± 0.0227 % (n=15, SEM=0.0059) y 0.0929 ± 0.0419 % (n=20, SEM=0.0094), respectivamente (FIG. 3). La fuente de células D contenía el tercer porcentaje más alto de las células que expresan el fenotipo de interés, 0.0632±0.0333 % (n=9, SEM=0.0111) (FIG. 3). Las fuentes de células C y E contenían los porcentajes más bajos de las células que expresan el fenotipo de interés, 0.0623±0.0249 % (n=15, SEM=0.0064) y 0.0457±0.0055 % (n=9, SEM=0.0018), respectivamente (FIG. 3).

Después de que las células HLA ABC$^-$/CD45$^-$/CD34$^-$/CD133$^+$ se identificaron y cuantificaron de cada fuente de células, sus células se analizaron y caracterizaron adicionalmente para determinar su expresión de marcadores de la superficie celular HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200, y CD105.

5.2.2.3 Células derivadas de perfusado placentario

Las células derivadas de perfusado fueron positivas de manera consistente para HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105, y CD13 (FIG. 4). La expresión promedio de cada marcador para células derivadas de perfusado fue la siguiente: 37.15 % ± 38.55 % (n=4, SEM=19.28) de las células expresaban HLA-G; 36.37 % ± 21.98 % (n=7, SEM=8.31) de las células expresaban CD33; 39.39 % ± 39.91 % (n=4, SEM=19.96) de las células expresaban CD117; 54.97 % ± 33.08 % (n=4, SEM=16.54) de las células expresaban CD10; 36.79 % ± 11.42 % (n=4, SEM=5.71) de las células expresaban CD44; 41.83 % ± 19.42 % (n=3, SEM=11.21) de las células expresaban CD200; 74.25 % ± 26.74 % (n=3, SEM=15.44) de las células expresaban CD90; 35.10 % ± 23.10 % (n=3, SEM=13.34) de las células expresaban CD38; 22.87 % ± 6.87 % (n=3, SEM=3.97) de las células expresaban CD105; y 25.49 % ± 9.84 % (n=3, SEM=5.68) de las células expresaban CD13.

5.2.2.4 Células derivadas de amnios

Las células derivadas de amnios fueron positivas de manera consistente para HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105, y CD13 (FIG 5). La expresión promedio de cada marcador para las células derivadas de amnios fue la siguiente: 57.27 % ± 41.11 % (n=3, SEM=23.73) de las células expresaban HLA-G; 16.23 % ± 15.81 % (n=6, SEM=6.46) de las células expresaban CD33; 62.32 % ± 37.89 % (n=3, SEM=21.87) de las células expresaban CD117; 9.71 % ± 13.73 % (n=3, SEM=7.92) de las células expresaban CD10; 27.03 % ± 22.65 % (n=3, SEM=13.08) de las células expresaban CD44; 6.42 % ± 0.88 % (n=2, SEM=0.62) de las células expresaban CD200; 57.61 % ± 22.10 % (n=2, SEM=15.63) de las células expresaban CD90; 63.76 % ± 4.40 % (n=2, SEM=3.11) de las células expresaban CD38; 20.27 % ± 5.88 % (n=2, SEM=4.16) de las células expresaban CD105; y 54.37 % ± 13.29 % (n=2, SEM=9.40) de las células expresaban CD13.

5.2.2.5 Células derivadas de corion

Las células derivadas de corion fueron positivas de manera consistente para HLA-G, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, y CD13, mientras la expresión de CD33, y CD105 varió (FIG. 6). La expresión promedio de cada marcador para células del corion fue la siguiente: 53.25 % ± 32.87 % (n=3, SEM=18.98) de las células expresaban HLA-G; 15.44 % ± 11.17 % (n=6, SEM=4.56) de las células expresaban CD33; 70.76 % ± 11.87 % (n=3, SEM=6.86) de las células expresaban CD117; 35.84 % ± 25.96 % (n=3, SEM=14.99) de las células expresaban CD10; 28.76 % ± 6.09 % (n=3, SEM=3.52) de las células expresaban CD44; 29.20 % ± 9.47 % (n=2, SEM=6.70) de las células expresaban CD200; 54.88 % ± 0.17 % (n=2, SEM=0.12) de las células expresaban CD90; 68.63 % ± 44.37 % (n=2, SEM=31.37) de las células expresaban CD38; 23.81 % ± 33.67 % (n=2, SEM=23.81) de las células expresaban CD105; y 53.16 % ± 62.70 % (n=2, SEM=44.34) de las células expresaban CD13.

5.2.2.6 Células placentarias de la fuente D

Las células de la placa amnios-corion fueron positivas de manera consistente para HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105, y CD13 (FIG. 7). La expresión promedio de cada marcador para las células derivadas de la placa amnios-corion fue la siguiente: 78.52 % ±13.13 % (n=2, SEM=9.29) de las células expresaban HLA-G; 38.33 % ± 15.74 % (n=5, SEM=7.04) de las células expresaban CD33; 69.56 % ± 26.41 % (n=2, SEM=18.67) de las células expresaban CD117; 42.44 % ± 53.12 % (n=2, SEM=37.56) de las células expresaban CD10; 32.47 % ± 31.78 % (n=2, SEM=22.47) de las células expresaban CD44; 5.56 % (n=1) de las células expresaban CD200; 83.33 % (n=1) de las células expresaban CD90; 83.52 % (n=1) de las células expresaban CD38; 7.25 % (n=1) de las células expresaban CD105; y 81.16 % (n=1) de las células expresaban CD13.

5.2.2.7 Células derivadas del cordón umbilical

Las derivadas del cordón umbilical fueron positivas de manera consistente para HLA-G, CD33, CD90, CD38, CD105, y CD13, mientras la expresión de CD117, CD10, CD44, y CD200 varió (FIG. 8). La expresión promedio de cada marcador para las células derivadas del cordón umbilical fue la siguiente: 62.50 % ± 53.03 % (n=2, SEM=37.50) de las células expresaban HLA-G; 25.67 % ± 11.28 % (n=5, SEM=5.04) de las células expresaban CD33; 44.45 % ±

62.85 % (n=2, SEM=44.45) de las células expresaban CD117; 8.33 % ± 11.79 % (n=2, SEM=8.33) de las células expresaban CD10; 21.43 % ± 30.30 % (n=2, SEM=21.43) de las células expresaban CD44; 0.0 % (n=1) de las células expresaban CD200; 81.25 % (n=1) de las células expresaban CD90; 64.29 % (n=1) de las células expresaban CD38; 6.25 % (n=1) de las células expresaban CD105; y 50.0 % (n=1) de las células expresaban CD13.

Un resumen de los promedios de la expresión de todos los marcadores se muestra en la FIG. 9.

5.2.2.8 Informe de la separación de BD FACS Aria

Las tres poblaciones distintas de las células placentarias que expresaban los porcentajes más altos de HLA ABC, CD45, CD34, y CD133 (células derivadas de perfusado, amnios y corion) se tiñeron con 7AAD y los anticuerpos para estos marcadores. Las tres poblaciones se separaron positivamente para células vivas que expresan el fenotipo de interés. Los resultados de la separación del BD FACS Aria se listan en la tabla 2.

Tabla 2:

Informe de sort del BD FACS Aria			
Fuente de las células	Eventos procesados	Eventos separados (Fenotipo de interés)	% del Total
Perfusado	135 540 110	51 215	0.037786
Amnios	7 385 933	4019	0.054414
Corion	108 498 122	4016	0.003701

Las tres poblaciones distintas de células separadas positivamente ("separadas") y sus células no separadas correspondientes se sembraron en placas y los resultados del cultivo se evaluaron en el día 12 (Tabla 3). Las células derivadas de perfusado separadas, sembradas en placas a una densidad celular de 40 600/cm^2, produjeron células pequeñas, redondas, no adherentes. Dos de los tres conjuntos de células derivadas de perfusado no separadas, cada uno sembrado en placas a una densidad celular de 40 600/cm^2, produjeron en su mayoría células pequeñas, redondas, no adherentes con varias células adherentes localizadas alrededor de la periferia del pocillo. Las células derivadas de perfusado no separadas, sembradas en placas a una densidad celular de 93 800/cm^2, produjeron en su mayoría células pequeñas, redondas, no adherentes con varias células adherentes localizadas alrededor de la periferia del pocillo.

Las células derivadas de amnios separadas, sembradas en placas a una densidad celular de 6300/cm^2, produjeron células pequeñas, redondas, no adherentes. Las células derivadas de amnios no separadas, sembradas en placas a una densidad celular de 6300/cm^2, produjeron células pequeñas, redondas, no adherentes. Las células derivadas de amnios no separadas, sembradas en placas a una densidad celular de 62 500/cm^2, produjeron células pequeñas, redondas, no adherentes.

Las células derivadas de corion separadas, sembradas en placas a una densidad celular de 6300/cm^2, produjeron células pequeñas, redondas, no adherentes. Las células derivadas de corion no separadas, sembradas en placas a una densidad celular de 6300/cm^2, produjeron células pequeñas, redondas, no adherentes. Las células derivadas de corion no separadas, sembradas en placas a una densidad celular de 62 500/cm^2, produjeron células pequeñas, redondas, no adherentes.

Las poblaciones de células madre placentarias descritas anteriormente, después de cultivo en plástico de cultivo tisular, se adhirieron a la superficie y asumieron una forma fibroblastoide característica.

5.3 Ejemplo 3: recogida de las células madre placentarias por perfusión en circuito cerrado

Este Ejemplo demuestra un método para recoger células madre placentarias por perfusión.

Se obtiene una placenta después del parto en las 24 horas después del nacimiento. El cordón umbilical se pinza con una pinza de cordón umbilical aproximadamente 0.08 a 0.10 centímetros (3 a 4 pulgadas) alrededor del disco placentario, y el cordón se corta por encima de la pinza. El cordón umbilical bien se desecha, o se procesa para recuperar, p. ej., células madre del cordón umbilical, y/o para procesar la membrana del cordón para la producción de un biomaterial. La membrana amniótica y corion en exceso se corta de la placenta, dejando aproximadamente 0.64 centímetros (0.25 pulgadas) alrededor del borde de la placenta. El material recortado se desecha.

Empezando a partir del borde de la membrana placentaria, la membrana amniótica se separa del corion usando disección roma con los dedos. Cuando la membrana amniótica está completamente separada del corion, la membrana amniótica se corta alrededor de la base del cordón umbilical con tijeras, y se despega del disco placentario. La

membrana amniótica puede desecharse, o puede procesarse, p. ej., para obtener células madre por digestión enzimática, o para producir, p. ej., un biomaterial de membrana amniótica.

El lado fetal del material placentario remanente se limpia de todos los coágulos sanguíneos visibles y sangre residual usando una gasa estéril, y después se esteriliza frotando con una torunda de yodo mejor que una torunda de alcohol. El cordón umbilical se pinza entonces transversalmente con un hemostato estéril por debajo de la pinza del cordón umbilical, y el hemostato se rota, tirando del cordón sobre la pinza para crear un plegamiento. El cordón se corta parcialmente entonces por debajo del hemostato para exponer una sección transversal del cordón soportado por la pinza. Alternativamente, el cordón se pinza con un hemostato estéril. El cordón se pone entonces en una gasa estéril y se mantiene con el hemostato para proporcionar tensión. El cordón se corta entonces al otro lado directamente por debajo del hemostato, y el borde del cordón cerca del vaso se vuelve a pinzar.

Los vasos expuestos como se ha descrito anteriormente, habitualmente una vena y dos arterias, se identifican, y se abren como sigue. Se hace avanzar una pina de cocodrilo cerrada a través del extremo de corte de cada vaso, teniendo cuidado para que la pinza no perfore a través de la pared del vaso. La inserción se para cuando la punta de la pinza está ligeramente por encima de la base del cordón umbilical. La pinza se abre entonces ligeramente, y se retira lentamente del vaso para dilatar el vaso.

El tubo de plástico, conectado a un dispositivo de perfusión o a una bomba peristáltica, se inserta en cada una de las arterias placentarias. El tubo de plástico, conectado a una bolsa se recogida de 250 mL, se inserta en la vena placentaria. El tubo se asegura en su lugar.

Un pequeño volumen de disolución estéril de grado de inyección de NaCl al 0.9 % para comprobar las fugas. Si no está presente ninguna fuga, la velocidad de la bomba se incrementa, y aproximadamente 750 mL de la disolución de grado de inyección de NaCl al 0.9 % se bombea a través de la vasculatura placentaria. La perfusión puede ayudarse masajeando suavemente el disco placentario desde los bordes exteriores al cordón. Cuando la bolsa de recogida está llena, la bolsa se retira del acoplador que conecta el tubo a la bolsa, y se conecta una nueva bolsa al tubo.

Cuando la recogida ha terminado, las bolsas de recogida se pesan y se equilibran para centrifugación. Después de la centrifugación, cada bolsa se pone en el interior de un extractor de plasma sin alterar el sedimento de las células. El sobrenadante en las bolsas se retira entonces y se desecha. La bolsa se masajea entonces suavemente para resuspender las células en el sobrenadante remanente. Usando una jeringa estéril de 1 mL, se toman aproximadamente 300-500 µL de las células de la bolsa de recogida, mediante un acoplador en el sitio de muestreo, y se transfieren a un tubo de centrífuga de 1.5 mL. Se determina el peso y volumen del perfusado remanente, y se añade 1/3 de volumen de hetastarch al perfusado y se mezcla concienzudamente. Se determina el número de células por mL. Las células sanguíneas rojas se eliminan del perfusado usando un extractor de plasma.

Las células placentarias se cultivan inmediatamente para aislar las células madre placentarias, o se criopreservan para un uso posterior.

5.4 Ejemplo 4: diferenciación de las células madre placentarias

5.4.1 Inducción de la diferenciación en neuronas

La diferenciación neuronal de las células madre placentarias también puede conseguirse como sigue:

1. Las células madre placentarias se crecen durante 24 hr en medio de preinducción que consiste en DMEM/20 % de FBS y beta-mercaptoetanol 1 mM.

2. El medio de preinducción se retira y las células se lavan con PBS.

3. Se añade a las células medio de inducción neuronal que consiste en DMEM y betamercaptoetanol 1-10 mM. Alternativamente, puede usarse medio de inducción que consiste en DMEM/2 % de DMSO/hidroxianisol butilado 200 µM.

4. En determinadas realizaciones, pueden ocurrir cambios morfológicos y moleculares tan pronto como 60 minutos después de la exposición a medio sin suero y betamercaptoetanol. Puede usarse RT/PCR para evaluar la expresión de, p. ej., los genes del receptor del factor de crecimiento nervioso y cadena pesada de neurofilamentos.

5.4.2 Inducción de la diferenciación en adipocitos

Se indujeron varios cultivos de las células madre placentarias derivadas de digestión enzimática del amnios, a 50-70 % de confluencia, en medio que comprendía (1) DMEM/MCDB-201 con 2 % de FCS, 0.5 % de hidrocortisona, isobutilmetilxantina 0.5 mM, indometacina 60 µM; o (2) DMEM/MCDB-201 con 2 % de FCS y 0.5 % de ácido linoleico. Las células se examinaron para detectar cambios morfológicos; después de 3-7 días, aparecieron gotitas de aceite.

La diferenciación también se evaluó por PCR cuantitativa en tiempo real para examinar la expresión de genes específicos asociados con la adipogénesis, es decir, PPAR-γ2, aP-2, lipoproteína lipasa, y osteopontina. Dos cultivos de las células madre placentarias mostraron un incremento de 6.5 veces y 24.3 veces en la expresión de genes específicos de adipocitos, respectivamente. Otros cuatro cultivos mostraron un incremento moderado (1.5- 2.0 veces) en la expresión de PPAR-γ2 después de la inducción de la adipogénesis.

En otro experimento, las células madre placentarias obtenidas de perfusado se cultivaron en DMEM/MCDB-201 (medio basal de fibroblastos de pollo) con 2 % de FCS. Las células se tripsinizaron y se centrifugaron. Las células se resuspendieron en medio de adipo-inducción (AIM) 1 o 2. El AIM1 comprendía Medio Basal MesenCult para células madre mesenquimales humanas (StemCell Technologies) suplementado con Suplementos Adipogénicos de Células Madre Mesenquimales (StemCell Technologies). El AIM2 comprendía DMEM/MCDB-201 con 2 % de FCS y LA-BSA (1 %). Se crecieron aproximadamente, 1.25 x 10^5 células madre placentarias en 5 mL de AIM1 o AIM2 en matraces T-25. Las células se cultivaron en incubadores durante 7-21 días. Las células desarrollaron vacuolas con gotitas de aceite en el citoplasma, como se confirmó por tinción con rojo aceite, lo que sugiere la diferenciación de las células madre en adipocitos.

La diferenciación adipogénica de las células madre placentarias también puede conseguirse como sigue:

1. Las células madre placentarias se crecen en MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con 15 % de suero de sangre del cordón.

2. Se usan tres ciclos de inducción/mantenimiento. Cada ciclo consiste en alimentar las células madre placentarias con Medio de Inducción de la Adipogénesis (Cambrex) y cultivar las células durante 3 días (a 37°C, 5 % de CO_2), seguido de 1 -3 días de cultivo en Medio de Mantenimiento de la Adipogénesis (Cambrex). Un medio de inducción alternativo que puede usarse contiene dexametasona 1 μM, indometacina 0.2 mM, 0.01 mg/ml de insulina, IBMX 0.5 mM, DMEM con alto contenido en glucosa, FBS, y antibióticos.

3. Después de 3 ciclos completos de inducción/mantenimiento, las células se cultivan durante 7 días adicionales en medio de mantenimiento de la adipogénesis, reemplazando el medio cada 2-3 días.

4. Una característica distintiva de la adipogénesis es el desarrollo de múltiples vesículas lipídicas intracitoplásmicas que pueden observarse fácilmente usando la tinción lipofílica rojo aceite O. La expresión de los genes de la lipasa y/o proteína de unión a ácidos grasos se confirma por RT/PCR en las células madre placentarias que han empezado a diferenciarse en adipocitos.

5.4.3 Inducción de la diferenciación en células osteogénicas

Se preparó medio osteogénico a partir de 185 mL de Medio Basal de Diferenciación Cambrex-Osteogénico y SingleQuots (uno de cada de dexametasona, L-glutamina, ascorbato, pen/estrep, MCGS, y β-glicerofosfato). Las células madre placentarias de perfusado se sembraron en placas, a aproximadamente 3 x 10^3 células por cm^2 de área superficial de cultivo tisular en 0.2-0.3 mL de MSCGM por cm^2 de área de cultivo tisular. Típicamente, todas las células se adhirieron a la superficie del cultivo durante 4-24 horas en MSCGM a 37 ºC en 5 % de CO_2. La diferenciación osteogénica se indujo reemplazando el medio con medio de Diferenciación Osteogénica. La morfología de las células empezó a cambiar de la apariencia típica con forma de huso de las células madre placentarias adherentes, a una apariencia cuboidal, acompañado por mineralización. Algunas células se delaminaron de la superficie del cultivo tisular durante la diferenciación.

La diferenciación osteogénica también puede conseguirse como sigue:

1. Se cultivan cultivos adherentes de las células madre placentarias en MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con 15 % de suero de sangre del cordón.

2. Los cultivos se cultivan durante 24 horas en matraces de cultivo tisular.

3. Se induce la diferenciación osteogénica reemplazando MSCGM con Medio de Inducción Osteogénica (Cambrex) que contiene dexametasona 0.1 μM, ácido ascórbico-2-fosfato 0.05 mM, beta glicerofosfato 10 mM.

4. Las células se alimentan cada 3-4 días durante 2-3 semanas con Medio de Inducción Osteogénica.

5. La diferenciación se ensaya usando una tinción específica de calcio y RT/PCR para la expresión génica de la fosfatasa alcalina y osteopontina.

5.4.4 Inducción de la diferenciación en células pancreáticas

La diferenciación pancreática se consigue como sigue:

1. Las células madre placentarias se cultivan en DMEM/20 % de CBS, suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/ml; y factor de crecimiento transformante beta-1, 2 ng/ml. Puede usarse Reemplazo de Suero KnockOut en lugar de CBS.

2. Se añade medio condicionado de cultivos de células neuronales positivas para nestina al medio a una concentración 50/50.

3. Las células se cultivan durante 14-28 días, realimentando cada 3-4 días.

4. La diferenciación se caracteriza mediante el ensayo de la proteína insulina o la expresión génica de la insulina RT/PCR.

5.4.5 Inducción de la diferenciación en células cardiacas

La diferenciación miogénica (cardiogénica) se consigue como sigue:

1. Las células madre placentarias se cultivan en DMEM/20 % de CBS, suplementado con ácido retinoico, 1 μM; factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/ml; y factor de crecimiento transformante beta-1, 2 ng/ml; y factor de crecimiento epidérmico, 100 ng/ml. Puede usarse Reemplazo de Suero KnockOut (Invitrogen, Carlsbad, California) en lugar de CBS.

2. Alternativamente, las células madre placentarias se cultivan en DMEM/20 % de CBS suplementado con 50 ng/ml de Cardiotropina-1 durante 24 horas.

3. Alternativamente, las células madre placentarias se mantienen en medio sin proteínas durante 5-7 días, después se estimulan con extracto de miocardio humano (análisis de escalada de la dosis). El extracto de miocardio se produce homogeneizando 1 g de miocardio humano en 1 % de tampón HEPES suplementado con 1 % de suero de sangre del cordón. La suspensión se incuba durante 60 minutos, después se centrifuga y se recoge el sobrenadante.

4. Las células se cultivan durante 10-14 días, con realimentación cada 3-4 días.

5. La diferenciación se confirma por la demostración de la expresión génica de la actina cardiaca por RT/PCR.

5.4.6 Inducción de la diferenciación en condrocitos

5.4.6.1 Método general

La diferenciación condrogénica de las células madre placentarias se consigue generalmente como sigue:

1. Las células madre placentarias se mantienen en MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con 15 % de suero de sangre del cordón.

2. Las células madre placentarias se dividen en partes alícuotas en un tubo estéril de polipropileno. Las células se centrifugan (150 x g durante 5 minutos), y se lavan dos veces en Medio de Condrogénesis Incompleto (Cambrex).

3. Después del último lavado, las células se resuspenden en Medio de Condrogénesis Completo (Cambrex) que contiene 0.01 μg/ml de TGF-beta-3 a una concentración de 5 x 10(5) células/ml.

4. Se dividen en partes alícuotas 0.5 ml de las células en un tubo de cultivo de polipropileno de 15 ml. Las células se sedimentan a 150 x g durante 5 minutos. El sedimento se deja intacto en el medio.

5. Se incuban tubos con el tapón flojo a 37 ºC, 5 % de CO_2 durante 24 horas.

6. Los sedimentos celulares se alimentan cada 2-3 días con medio de condrogénesis completo recién preparado.

7. Los sedimentos se mantienen suspendidos en el medio por agitación diaria usando un vórtex a baja velocidad.

8. Los sedimentos de las células condrogénicas se recogen después de 14-28 días en cultivo.

9. La condrogénesis se caracteriza, p. ej., por la observación de la producción de sustancia de fondo eosinofílico, evaluación de la morfología celular, y/o confirmación por RT/PCR de la expresión de los genes de colágeno 2 y/o colágeno 9 y/o la producción de mucopolisacáridos ácidos de la matriz de cartílago, como se confirma por tinción citoquímica con azul Alcián.

5.4.6.2 Diferenciación de las células madre placentarias y del cordón umbilical en células condrogénicas

El Ejemplo demuestra la diferenciación de las células madre placentarias en células condrogénicas y el desarrollo de tejido semejante a cartílago a partir de dichas células.

El cartílago es un tejido alinfático avascular que carece de un suministro nervioso. El cartílago tiene una baja densidad de condrocitos (<5 %), sin embargo, estas células son sorprendentemente eficientes en el mantenimiento de la matriz extracelular que los rodea. En el cuerpo existen tres tipos principales de cartílago: (1) cartílago articular, que facilita la lubricación articular en las articulaciones; (2) fibrocartílago, que proporciona una absorción del choque, p. ej., en el menisco y el disco intervertebral; y (3) cartílago elástico, que proporciona estructura anatómica, p. ej., en la nariz y las orejas. Los tres tipos de cartílago son similares respecto a la estructura bioquímica.

El dolor articular es una causa principal de discapacidad y proporciona una necesidad no satisfecha de alivio en el área de la ortopedia. La osteoartritis primaria (que puede causar degeneración articular), y el trauma son dos causas comunes de dolor. Aproximadamente, el 9 % de la población de los EE.UU. tiene osteoartritis de cadera o rodilla, y cada año se realizan más de 2 millones de cirugías de rodilla. Desafortunadamente, los tratamientos actuales están más dirigidos hacia el tratamiento de los síntomas en lugar de a la reparación del cartílago. La reparación natural se produce cuando las células semejantes a fibroblastos invaden el área y la rellenan con tejido fibroso que no es ni tan resiliente ni elástico como el tejido normal, causando, por lo tanto, más daño. Las opciones de tratamiento han incluido históricamente injertos de tejido, perforación subcondral, o reemplazo total de la articulación. Los tratamientos más recientes incluyen, sin embargo, CARTICEL®, una inyección de condrocitos autólogos; SYNVISC® y ORTHOVISC®, que son inyecciones de ácido hialurónico para el alivio temporal del dolor; y CHONDROGEN™, una inyección de células madre mesenquimales de adulto para la reparación del menisco. En general, la tendencia parece estar basada más en terapias celulares y/o productos tisulares modificados por ingeniería que implican condrocitos o células madre.

Materiales y métodos.

Se usaron dos líneas de células madre placentarias, designadas AC61665, P3 (subcultivo 3) y AC63919, P5, y dos líneas de células madre del cordón umbilical, designadas UC67249, P2 y UC67477, P3 en los estudios indicados más adelante. Las células madre mesenquimales (MSC) humanas se usaron como controles positivos, y una línea celular de osteosarcoma, MC3T3, y fibroblastos dérmicos humanos (HDF) se usaron como controles negativos.

Las células madre placentarias y del cordón umbilical se aislaron y purificaron a partir de placenta humana a término por digestión enzimática. Las células MSC humanas y las células HDF se adquirieron en Cambrex, y las células MC3T3 se adquirieron en la American Type Culture Collection. Todas las líneas celulares se centrifugaron en sedimentos en tubos de centrífuga de polipropileno a 800 RPM durante 5 minutos y se crecieron tanto en medio de inducción condrogénica (Cambrex) como en medio MSC basal no inductor (Cambrex). Los sedimentos se recogieron y se analizaron histológicamente a los 7, 14, 21 y 28 días por tinción para glicosaminoglicanos (GAG) con Azul Alcián, y/o para colágenos con Rojo Sirio. El tipo de colágeno se evaluó adicionalmente con inmunotinción. El análisis de ARN para los genes específicos de cartílago se realizó a los 7 y 14 días.

Resultados

Experimento 1: los estudios de condrogénesis se diseñaron para conseguir tres objetivos principales: (1) demostrar que las células madre placentarias y del cordón umbilical pueden diferenciarse y formar tejido de cartílago; (2) demostrar que las células madre placentarias y del cordón umbilical pueden diferenciarse funcionalmente en condrocitos; y (3) validar los resultados obtenidos con las células madre mediante la evaluación de líneas celulares control.

Para el objetivo 1, en un estudio preliminar, una línea de células madre placentarias se cultivó en medio de inducción condrogénica en la forma de sedimentos celulares, bien con o sin proteína morfogénica ósea (BMP) a una concentración final de 500 ng/mL. Los sedimentos se evaluaron para detectar evidencia de inducción condrogénica cada semana durante 4 semanas. Los resultados indicaron que el tamaño de los sedimentos se incrementaba con el tiempo. Sin embargo, no se observaron diferencias visuales entre las muestras BMP^+ y BMP^-. Los sedimentos también se analizaron histológicamente para GAG, un indicador de tejido de cartílago, por tinción con Azul Alcián. Las células BMP^+ aparecieron generalmente más activas metabólicamente con vacuolas claras mientras las células BMP^- fueron más pequeñas con núcleos teñidos de forma densa y menos citoplasma (refleja baja actividad metabólica). A los 7 días, las células BMP^+ se habían teñido de azul fuertemente, mientras las BMP^- solo se habían teñido débilmente. Sobre los 28 días de inducción, tanto las células BMP^+ como BMP^- se habían teñido casi de forma equivalente con Azul Alcián. Globalmente, la densidad celular disminuyó con el tiempo, y la matriz la sobrepasó en el sedimento. Por el contrario, la línea celular negativa MC3T3 no demostró ninguna presencia de GAG cuando se tiñó con Azul Alcián.

Experimento 2: sobre la base de los resultados del Experimento 1, se diseñó un estudio más detallado para evaluar el potencial de diferenciación condrogénica de dos líneas de células madre placentarias y dos de células madre del cordón umbilical. Además de la histología con Azul Alcián, las células también se tiñeron con Rojo Sirio, que es específico para colágeno tipo II. Se prepararon múltiples sedimentos para cada línea celular, con y sin medio de inducción.

Las líneas celulares cultivadas sedimentadas se evaluaron en primer lugar por observación gruesa para detectar la generación macroscópica de cartílago. Globalmente, se observó que las líneas de células madre producían sedimentos tan pronto como el día 1. Estos sedimentos crecieron con el tiempo y formaron una matriz firme, apareciendo blancos, brillantes y semejantes a cartílago, y volviéndose mecánicamente firmes. Por inspección visual, los sedimentos de las células madre placentarias o células madre del cordón umbilical fueron mucho mayores que los controles MSC. Los sedimentos control en el medio no de inducción empezaron a separarse sobre el Día 11, y fueron mucho más pequeños a los 28 días que los sedimentos desarrollados por las células cultivadas en medio de inducción condrogénica. Visualmente, no hubo diferencias entre los sedimentos formados por las células madre placentarias o del cordón umbilical. Sin embargo, la línea de células madre UC67249, que se inició en medio sin dexametasona, formó sedimentos mayores. Las células MC3T3 de control negativo no formaron sedimentos; sin embargo, las HDF sí formaron sedimentos.

Los sedimentos representativos de todos los grupos de ensayo se sometieron entonces a análisis histológico para determinar GAG y colágeno. Generalmente, los sedimentos formados por las células madre bajo condiciones inductoras eran mucho mayores y permanecieron intactos mejor que los sedimentos formados bajo condiciones no inductoras. Los sedimentos formados bajo condiciones inductoras mostraron la producción de GAG y un contenido de colágeno creciente con el tiempo, y tan pronto como en siete días, mientras los sedimentos formados bajo condiciones no inductoras mostraron una pequeña o ninguna producción de colágeno, como se manifiesta por la débil tinción con Azul Alcián. En general, las células madre placentarias y las células madre del cordón umbilical parecieron, por inspección visual, producir sedimentos más firmes, mayores, y parecieron producir más colágeno con el tiempo, que las hMSC. Además, durante el curso del estudio, el colágeno pareció engrosarse, y el tipo de colágeno pareció cambiar, como se manifiesta por cambios en los colores de las fibras bajo luz polarizada (los colores se correlacionan con el grosor de las fibras lo que puede ser indicativo del tipo de colágeno). Las células madre placentarias no inducidas produjeron mucho menos colágeno tipo II, si es que lo produjeron, comparado con las células madre inducidas. Durante el periodo de 28 días, la densidad celular disminuyó al incrementarse la producción de la matriz, una característica del tejido de cartílago.

Estos estudios confirman que las células madre placentarias y de cordón umbilical pueden diferenciarse a lo largo de una ruta condrogénica, y pueden inducirse fácilmente para formar tejido de cartílago. Las observaciones iniciales indican que dichas células madre son preferibles a las MSC para la formación de tejido de cartílago.

5.5 Ejemplo 5: cultivo de gota colgante de las células madre placentarias

Las células madre placentarias adherentes en cultivo se tripsinizan a 37 ºC durante aproximadamente 5 minutos, y se sueltan de placa de cultivo golpeando suavemente. Se añade 10 % de FBS al cultivo para parar la tripsinización. Las células se diluyen hasta aproximadamente 1 x 10^4 células por mL en aproximadamente 5 mL de medio. Se ponen gotas (bien una única gota o gotas de una micropipeta multicanal) en la parte interior de la tapa de una placa Petri de 100 mL. La tapa se invierte cuidadosamente y se pone en la parte superior de la parte inferior de la placa, que contiene aproximadamente 25 ml de PBS estéril para mantener el contenido de humedad en la atmósfera de la placa. Las células se crecen durante 6-7 días.

5.6 Ejemplo 6: digestión de tejido placentario para obtener células madre placentarias

Este Ejemplo demuestra un aislamiento con aumento de escala de las células madre placentarias por digestión enzimática.

Aproximadamente 10 gramos de tejido placentario (amnios y corion) se obtiene, macera, y digiere usando volúmenes iguales de colagenasa A (1 mg/ml) (Sigma) y Tripsina-EDTA (0.25 %) (Gibco-BRL) en un volumen total de aproximadamente 30 ml durante aproximadamente 30 minutos a 37°C. Las células liberadas por la digestión se lavan 3X con medio de cultivo, se distribuyen en cuatro matraces T-225 y se cultivan como se ha descrito en el Ejemplo 1. El rendimiento de las células madre placentarias es entre aproximadamente 4 x 10^8 y 5 x 10^8 células por 10g de material de partida. Las células, caracterizadas en el subcultivo 3, son predominantemente $CD10^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$ y $CD45^-$.

5.7 Ejemplo 7: producción de producto de células madre criopreservado y banco de células madre

Este Ejemplo demuestra el aislamiento de células madre placentarias y la producción de un producto congelado basado en células madre.

Resumen: el tejido placentario se diseccionó y digirió, seguido de cultivos primarios y expandidos para conseguir un producto celular expandido que produce muchas dosis celulares. Las células se almacenan en un banco celular de dos niveles y se distribuyen como un producto celular congelado. Todas las dosis celulares derivadas de una única placenta donante se definen como un lote, y un lote de placenta se procesa cada vez usando una técnica estéril en

una habitación especializada y campana de flujo laminar de Clase 100. El producto celular se define como $CD105^+$, $CD200^+$, $CD10^+$, y $CD34^-$, teniendo un cariotipo normal y ausencia de contenido celular materno.

5.7.1 Obtención de células madre

Disección y digestión del tejido: se obtiene una placenta menos de 24 horas después de la expulsión. Se obtiene tejido placentario a partir del amnios, una combinación de amnios y corion, o corion. El tejido se trocea en pequeñas partes, con un tamaño de aproximadamente 1 mm. El tejido troceado se digiere en 1 mg/ml de Colagenasa 1A durante 1 hora a 37 ºC seguido de Tripsina-EDTA durante 30 minutos at 37 ºC. Después de tres lavados en 5 % de FBS en PBS, el tejido se resuspende en medio de cultivo.

Cultivo primario: el propósito del cultivo primario es establecer células a partir del tejido placentario digerido. El tejido digerido se suspende en medio de cultivo y se pone en matraces T de Corning, que se incuban en una cámara humidificada mantenida a 37 ºC con 5 % de CO_2. La mitad del medio se repone después de 5 días de cultivo. Sobre las 2 semanas de cultivo se forman colonias de células de alta densidad. Las colonias se recogen con Tripsina-EDTA, que se para después con 2 % de FBS en PBS. Las células se centrifugan y se resuspenden en medio de cultivo para sembrar los cultivos de expansión. Estas células se definen como células de Subcultivo 0 que se han duplicado 0 veces.

Cultivo de expansión: las células recogidas del cultivo primario, recogidas del cultivo de expansión, o descongeladas del banco celular se usan para sembrar los cultivos de expansión. Se tratan Cell Factories (NUNC™) con 5 % de CO_2 en aire a 50 ml/min/bandeja durante 10 min a través de un filtro estéril y se calientan en un incubador humidificado mantenido a 37°C con 5 % de CO_2. Las siembras celulares se cuentan en un hemocitómetro con azul de tripán, y se registran el número, viabilidad, número de subcultivo, y el número acumulativo de duplicaciones de las células. Las células se suspenden en medio de cultivo hasta aproximadamente 2.3×10^4 células/ml y se siembran 110 ml/bandeja en las Cell Factories. Después de 3- 4 días y de nuevo a los 5-6 días de cultivo, el medio de cultivo se retira y se reemplaza con medio fresco, seguido de otro tratamiento con 5 % de CO_2 en aire. Cuando las células alcanzan aproximadamente 10^5 células/cm^2, las células se recogen con Tripsina-EDTA, seguido de parada con 2 % de FBS en PBS. Las células se centrifugan entonces y se resuspenden en medio de cultivo.

Criopreservación: las células que se van a congelar se recogen del cultivo con Tripsina-EDTA, se para con 2 % de FBS en PBS, y se cuentan en un hemocitómetro. Después de centrifugar, las células se resuspenden con 10 % de DMSO en FBS hasta una concentración de aproximadamente 1 millón de células/ml para las células que se van a usar para constituir un banco celular, y 10 millones de células/ml para dosis celulares individuales congeladas. La disolución celular se transfiere a un contenedor de congelación, que se pone en un baño de alcohol isopropílico en un congelador a -80 ºC. Al día siguiente, las células se transfieren a nitrógeno líquido.

5.7.2 Diseño de un banco de células madre

Un "lote" se define como todas las dosis celulares derivadas de una única placenta donante. Las células mantuvieron un crecimiento, cariotipo, y fenotipo de marcadores de la superficie celular normales durante más de 8 subcultivos y 30 duplicaciones durante el cultivo de expansión. Dada esta limitación, las dosis comprenden células de 5 subcultivos y aproximadamente 20 duplicaciones. Para generar un suministro de células equivalentes, se expande un único lote en cultivo y se almacena en un banco celular de dos niveles y en dosis congeladas. En particular, las células recogidas del cultivo primario, que se definen como células de Subcultivo 0 que han experimentado 0 duplicaciones, se usan para iniciar un cultivo de expansión. Después del primer subcultivo, se producen aproximadamente 4 duplicaciones, y las células se congelan en un Banco Celular Maestro (MCB). Los viales del MCB se usan para sembrar cultivos de expansión adicionales. Después de dos subcultivos adicionales de las células descongeladas del MCB, las células se congelan en un Banco Celular de Trabajo (WCB), aproximadamente 12 duplicaciones acumulativas. Los viales del WCB se usan para sembrar un cultivo de expansión para otros 2 subcultivos, lo que produce células de Subcultivo 5 a aproximadamente 20 duplicaciones que se congelan en dosis individuales.

5.7.3 Descongelación de las células para cultivo

Los contenedores congelados de las células se ponen en una bolsa de plástico sellada y se sumergen en un baño de agua a 37 ºC. Los contenedores se giran suavemente hasta que todos los contenidos se funden excepto un pequeño trozo de hielo. Los contenedores se retiran de la bolsa de plástico sellada y se añade lentamente a las células un volumen 10X de medio de cultivo con mezclado suave. Se cuenta una muestra en el hemocitómetro y se siembra en cultivos de expansión.

5.7.4 Descongelación de las células para inyección

Los contenedores congelados de las células se transfieren al sitio de administración en un embalaje con nitrógeno seco. Antes de la administración, los contenedores se ponen en una bolsa de plástico sellada y se sumergen en un

baño de agua a 37 ºC. Los contenedores se giran suavemente hasta que todos los contenidos se funden excepto un pequeño trozo de hielo. Los contenedores se retiran de la bolsa de plástico sellada y se añade un volumen igual de 2.5 % de HSA/5 % de Dextrano. Las células se inyectan sin lavado adicional.

5.7.5 Ensayos y especificaciones

Una muestra de sangre materna acompaña a todas las placentas donantes. La muestra se criba para detectar anticuerpo contra el antígeno central y antígeno de superficie de la Hepatitis B, anticuerpos del virus de la Hepatitis C y ácido nucleico, y anticuerpo de VIH I y II y ácido nucleico. El procesamiento de la placenta y el cultivo primario empieza antes de la repetición de los resultados de los ensayos, pero continúa solo para las placentas asociadas con muestras de sangre materna que hayan dado negativo en los ensayos para todos los virus. Un lote se rechaza si el donante da positivo en los ensayos para cualquier patógeno. Además, los ensayos descritos en la Tabla 3 se realizan en el MCB, el WCB, y una muestra del material de la dosis celular derivado de un vial del WCB. Un lote se lanza solo cuando se cumplen todas las especificaciones.

Tabla 3: Ensayos y especificaciones de las células

Ensayo	Métodos	Resultado requerido
Esterilidad	BD BACTEC PEDS PLUS/F y BACTEC Mico/F Lítico	Negativo
Endotoxina	LAL gel clot	≤ 5 EU/ml*
Viabilidad	Azul de Tripán	> 70 % viables
Micoplasma	Cultivo directo, ADN-fluorocromo (FDA PTC 1993)	Negativo
Identidad	Citometría de flujo (véase más adelante)	$CD105^+$, $CD200^+$, $CD10^+$, $CD34^-$
Pureza celular	Microsatélite	Sin células contaminantes detectadas
Cariotipo	Bandeo G y recuento de cromosomas en células en metafase	Normal

*Para el producto diseñado para ser 40 ml de células congeladas/dosis y un máximo de 5 EU/ml, el producto celular está por debajo del límite superior de 5EU/kg/dosis para los receptores con más de 40kg de peso corporal.

5.7.6 Análisis del fenotipo de los marcadores de superficie

Las células se ponen en 1 % de paraformaldehído (PFA) en PBS durante 20 minutos y se almacenan en una nevera hasta la tinción (hasta una semana). Las células se lavan con 2 % de FBS, 0.05 % de azida de sodio en PBS (Tampón de Tinción) y entonces se resuspenden en tampón de tinción. Las células se tiñen con los siguientes conjugados de anticuerpos: CD105-FITC, CD200-PE, CD34-PECy7, CD10-APC. Las células también se tiñen con controles de isotipo. Después de una incubación de 30 minutos, las células se lavan y se resuspenden con Tampón de Tinción, seguido de análisis en un citómetro de flujo. Las células que tienen una fluorescencia incrementada comparado con los controles de isotipo se cuentan como positivas para un marcador.

5.8 Ejemplo 8: identificación de genes específicos de células madre placentarias

Los patrones de expresión génica de las células madre placentarias de amnios-corion (AC) y cordón umbilical (UC) se compararon con los patrones de expresión génica de células madre mesenquimales multipotentes derivadas de la médula ósea (BM) y fibroblastos dérmicos (DF), considerándose estos últimos con diferenciación terminal. Las células se crecieron durante un único subcultivo, un número intermedio de subcultivos, y un gran número de subcultivos (incluyendo hasta la senescencia). Los resultados indican que el número de duplicaciones de las poblaciones tiene un gran impacto en la expresión génica. Se identificó un conjunto de genes que están regulados al alza en AC y UC, y bien regulados a la baja o ausentes en BM y DF, y que se expresan independientemente del número de subcultivos. Este conjunto de genes específicos de células madre placentarias o células madre del cordón umbilical codifica un número de proteínas del citoesqueleto y de adhesión célula a célula asociadas con las células epiteliales y una proteína de superficie semejante a inmunoglobulina, CD200, implicada en la tolerancia inmune materno-fetal. Las células madre placentarias y las células madre del cordón umbilical se referirán colectivamente en la presente memoria de aquí en adelante en este Ejemplo como células madre AC/UC.

5.8.1 Métodos y materiales

5.8.1.1 Células y cultivo celular

Se adquirieron BM (No. de cat. PT-2501) y DF (No. de cat. CC-2511) en Cambrex. AC y UC se originaron de matraces de cultivo tisular de subcultivo 0. AC y UC en los matraces se obtuvieron por digestión a partir de una placenta donante designada 2063919. Los matraces de cultivo T-75 se sembraron a 6000 células/cm^2 y las células se subcultivaron cuando fueron confluentes. Las duplicaciones de las poblaciones se estimaron a partir de los recuento celulares con azul de tripán. Los cultivos se ensayaron para determinar la expresión génica después de 3, 11-14, y 24-38 duplicaciones de poblaciones.

5.8.1.2 ARN, micromatrices y análisis

Las células se lisaron directamente en sus matraces de cultivo tisular, con la excepción de un cultivo que se tripsinizó antes de la lisis. El ARN total se aisló con el kit RNeasy de QIAGEN. La integridad y las concentraciones del ARN se determinaron con un Bioanalizador Agilent 2100. Diez microgramos de ARN total de cada cultivo se hibridaron en una plataforma Affymetrix GENECHIP®. El ARN total se convirtió en ARNc marcados y se hibridaron con matrices de oligonucleótidos Human Genome U133A 2.0 según los métodos del fabricante. Los archivos de imágenes se procesaron con el software Affymetrix MAS 5.0, y se normalizaron y analizaron con el software Agilent GeneSpring 7.3.

5.8.2 Resultados

5.8.2.1 Selección de puntos de tiempo en el cultivo de BM-MSC, célula madre AC/UC, y DF para análisis con micromatrices

Para establecer un patrón de expresión génica único para las células madre AC/UC, se cultivaron dos líneas de células madre, AC(6) y UC(6), en paralelo con BM-MSC y DF. Para maximizar la identificación de un perfil de expresión génica atribuible al origen celular y para minimizar las influencias exógenas, todas las células se crecieron en el mismo medio, se sembraron, y subcultivaron usando los mismos criterios. Las células se recogieron después de 3 duplicaciones de las poblaciones, 11-14 duplicaciones, o 35 duplicaciones o senescencia, lo que ocurriera antes. Los genes cuya expresión en células madre AC/UC está inalterada por el tiempo en cultivo y está regulada al alza respecto a BM y DF son candidatos para genes específicos de células madre AC/UC.

La FIG. 10 muestra los perfiles de crecimiento para las cuatro líneas celulares en el estudio; los círculos indican qué cultivos se recogieron para el aislamiento del ARN. En total, se recogieron doce muestras. BM, AC(6), y UC(6) se recogieron después de tres duplicaciones de las poblaciones; estas muestras se consideraron como que habían estado en cultivo durante un "corto" periodo de tiempo. Una muestra DF de duración corta no se recogió. Los cultivos de duración intermedia, 11 a 14 duplicaciones, se recogieron para todos los tipos celulares. Los cultivos de duración larga se recogieron de todas las líneas celulares a aproximadamente 35 duplicaciones de las poblaciones o justo antes de la senescencia, lo que ocurriera antes. La senescencia ocurrió antes de las 15 duplicaciones para BM y a las 25 duplicaciones para DF. Las células BM y DF adquiridas se expandieron muchas veces antes del análisis génico, y no pueden considerarse en estadio temprano. Sin embargo, operacionalmente, las BM crecidas durante tres duplicaciones (BM-03) se consideran un cultivo de duración corta. Asimismo, BM-11 se refiere operacionalmente como un cultivo de duración intermedia, pero como la senescencia ocurría a las 14 duplicaciones, BM-11 es lo más probablemente, desde un punto de vista biológico, un cultivo l de duración larga.

5.8.2.2 La agrupación jerárquica muestra una relación entre BM, células madre AC/UC, y DF

El análisis por micromatrices identifica patrones de expresión génica, y los intentos de agrupación jerárquica (HC) para encontrar similitudes en el contexto de dos dimensiones - genes en la primera dimensión y diferentes condiciones (diferentes muestras de ARN) en la segunda. Los GeneChips usados en este experimento contenían más de 22 000 conjuntos de sondas (referidas como la "lista de todos los genes"), pero muchos de estos conjuntos interrogan genes que no se expresan en cualquier condición. Para reducir la lista de todos los genes, los genes no expresados o expresados a niveles bajos (valores brutos por debajo de 250) en todas las muestras se eliminaron para rendir una lista de 8215 genes.

5.8.2.3 Análisis de la expresión génica usando la vista del gráfico de líneas

Los patrones de expresión génica de los 8215 genes se presentaron usando la vista del gráfico de líneas en GeneSpring (FIG. 11). El eje de las x muestra las doce condiciones experimentales y el eje de las y muestra los valores de expresión normalizados del conjunto de sondas en una escala logarítmica. El eje de las y abarca un rango de 10 000 veces, y los genes que no se expresan o se expresan a niveles muy bajos se ajustan a un valor de 0.01. Por defecto, el valor normalizado se ajusta a 1. Cada línea representa un único gen (realmente, un conjunto de sondas, algunos genes tienen múltiples conjuntos de sondas) y discurre en las doce condiciones como un único color. Los colores representan niveles de expresión relativos, como se describe para los mapas de calor, pero el patrón de color se determina seleccionando una condición. AC-03 es la condición seleccionada en la FIG. 11. Los genes regulados al alza respecto al valor normalizado se representan por el software como rojos, y aquellos que están regulados a la

baja, se representan como azules. Los picos que apuntan hacia arriba y hacia abajo obvias en AC-03 a UC-11 indican que muchos genes se expresan de manera diferente en estas condiciones. La similitud llamativa en los patrones de color entre AC-03 y UC-03 muestran que muchos de los mismos genes están regulados al alza o a la baja en estas dos muestras. Los segmentos de líneas horizontales indican que el nivel de expresión de un gen no se altera a lo largo de varias condiciones. Esto es muy notable comparando UC-36, UC-38, y UC-38-T. No hay picos obvios, pero hay una tendencia sutil en que un número de líneas rojas entre UC-36 y UC-38-T están por debajo del valor normalizado de 1. Esto indica que estos genes, que están regulados al alza en AC-03 y UC-03, están regulados a la baja en los cultivos posteriores. El hecho de que los patrones de expresión entre UC-38 y UC-38-T sean tan similares indica que la tripsinización de las células justo antes del aislamiento del ARN tiene poco efecto en la expresión génica.

Además del método HC computacionalmente intensivo, por inspección visual, las dos muestras de BM son más similares entre sí que a las demás condiciones. Lo mismo es cierto para los dos cultivos de DF. Y, a pesar del gran número de genes expresados de forma diferencial presentes en las muestras de BM y DF, la apariencia general sugiere que las dos BM y las dos DF son más similares entre sí que a las células madre AC/UC. Esto se confirma por los resultados de HC descritos anteriormente.

Cuando el proceso anterior se aplica usando AC-11 como la condición seleccionada, está claro que AC-11 y UC-11 comparten muchos de los genes expresados de forma diferencial, pero el número total de genes en común entre estas dos condiciones parece menor que el número de genes expresados de forma diferencial compartidos por AC-03 y UC-03. La FIG. 12 muestra genes sobreexpresados de forma diferencial, seis veces o más respecto a la línea base, en AC-03. La mayoría de los genes regulados al alza en AC-03 también están regulados al alza en UC-03, y más divergente en BM y DF.

5.8.2.4 Métodos de filtrado usados para identificar genes específicos de células madre AC/UC

Los genes que permanecen constantes a lo largo de todas las muestras de AC/UC, y que están regulados a la baja en BM y DF, se consideran específicos de las células madre AC/UC. Se combinaron dos métodos de filtrado para crear una lista de 58 genes específicos de las células madre AC/UC (Tabla 4). '

Tabla 4: 58 genes específicos de células madre placentarias o células madre del cordón umbilical

Símbolo	**Gen**	**Proceso Biológico, Descripción, y Anotación Adicional**
ACTG2	actina, gamma 2, músculo liso, entérico	desarrollo muscular, citoesqueleto, expresado en la arteria del cordón umbilical y epitelios de la próstata
ADARB1	adenosina desaminasa, específico de ARN, B1 (homólogo de rata RED1)	procesamiento del ARN, desarrollo del sistema nervioso central
AMIGO2	gen inducido por anfoterina 2	adhesión celular homofílica y heterofílica, molécula de adhesión con dominio semejante a Ig 2
ARTS-1	regulador aminopeptidasa que libera el receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1	proteólisis, procesamiento de antígenos, angiogénesis, expresado en placenta
B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosiltransferasa, polipéptido 6	metabolismo de carbohidratos, integral en la membrana, puede funcionar en el reconocimiento y/o adhesión intercelular
BCHE	butirilcolinesterasa	actividad colinesterasa, actividad serina esterasa, actividad hidrolasa
C11orf9	marco de lectura abierto 9 del cromosoma 11	proteína hipotética, factor de transcripción semejante a p53, expresado en el epitelio del pigmento retinal
CD200	antígeno CD200	semejante a inmunoglobulina, proteína de superficie, inhibe los macrófagos
COL4A1	colágeno, tipo IV, alfa I	ECM, membrana del basamento, colágeno afibrilar, contiene dominio arresten
COL4A2	colágeno, tipo IV, alfa 2	ECM, biogénesis, membrana del basamento, coexpresado con COL4A1, regulado a la baja en epitelios displásicos

CPA4	carboxipeptidasa A4	proteolítico, acetilación de histonas, impronta materna, alta expresión en líneas celulares de cáncer de próstata
DMD	distrofina (distrofia muscular, tipos Duchenne y Becker)	contracción muscular, control de la forma celular y del tamaño celular, desarrollo muscular
DSC3	desmocolina 3	adhesión célula-célula homofílica, localizado en los desmosomas
DSG2	desmogleína 2	adhesión célula-célula homofílica, localizado en los desmosomas
ELOVL2	elongación de ácidos grasos de cadena muy larga (semejante a FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, levadura 2)	biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis de lípidos
F2RL1	semejante al receptor del factor II de coagulación (trombina) 1	ruta de señalización de proteínas receptoras acopladas a proteínas G, altamente expresado en epitelios del colon y elementos neuronales
FLJ10781	proteína hipotética FLJ10781	-
GATA6	proteína de unión a GATA 6	factor de transcripción, desarrollo muscular
GPR126	receptor acoplado a proteína G 126	transducción de señales, ruta de señalización de neuropéptidos
GPRC58	receptor acoplado a proteína G, familia C, grupo 5, miembro B	ruta de señalización de proteínas receptoras acopladas a proteínas G
ICAM1	molécula de adhesión intercelular 1 (CD54), receptor de rinovirus humano	adhesión célula-célula, adhesión celular, actividad de receptor transmembrana, expresado en el epitelio conjuntival
IER3	respuesta inmediata temprana 3	anti-apoptosis, embriogénesis y morfogénesis, crecimiento y/o mantenimiento celular
IGFBP7	proteína de unión al factor de crecimiento semejante a insulina 7	regulación negativa de la proliferación celular, sobreexpresado en células epiteliales senescentes
IL1A	interleuquina 1, alfa	respuesta inmune, transducción de señales, actividad citoquina, proliferación celular, diferenciación, apoptosis
IL1B	interleuquina 1, beta	respuesta inmune, transducción de señales, actividad citoquina, proliferación celular, diferenciación, apoptosis
IL6	interleuquina 6 (interferón, beta 2)	transducción de señales ligada a receptor de la superficie celular, respuesta inmune
KRT18	queratina 18	morfogénesis, filamento intermedio, expresado en tejidos placentarios, fetales y epiteliales
KTR8	queratina 8	organización y biogénesis del citoesqueleto, fosforilación, filamento intermedio, coexpresado con KRTIB
LIPG	lipasa, endotelial	metabolismo de lípidos, actividad lipoproteína lipasa, transportador de lípidos, actividad fosfolipasa, implicado en la biología vascular
LRAP	aminopeptidasa de arginina derivada de leucocitos	procesamiento de antígenos, antígeno endógeno a través de MHC clase I; actividad aminopeptidasa N-terminal
MATN2	matrilina 2	ampliamente expresado en líneas celulares de origen fibroblástico o

		epitelial, ECM de cartílago no articular
MEST	homólogo del transcrito específico del mesodermo (ratón)	gen con impronta paterna, desarrollo de tejidos mesodérmicos, expresado en tejidos fetales y fibroblastos
NFE2L3	semejante a factor nuclear (derivado de eritroide 2) 3	cofactor de transcripción, altamente expresado en citotrofoblastos placentarios primarios, pero no en fibroblastos placentarios
NUAK1	familia NUAK, quinasa semejante a SNF1, I	fosforilación de aminoácidos proteicos, actividad proteína quinasa de serina-treonina
PCDH7	BH-protocadherina (cerebro-corazón)	adhesión y reconocimiento célula-célula, que contiene 7 repeticiones de cadherina
PDLIM3	PDZ y LIM dominio 3	proteína LIM asociada a alfa-actinina-2, unión a proteínas del citoesqueleto, expresado en músculo esquelético
PKP2	placofilina 2	adhesión célula-célula, localizado en los desmosomas, encontrado en epìtelios, se une a cadherinas y filamento intermedio
RTN1	reticulón 1	transducción de señales, diferenciación neuronal, secreción neuroendocrina, transporte en membrana en células neuroendocrinas
SERPINB9	inhibidor de peptidasa serpina, grupo B (ovoalbúmina), miembro 9	inhibidor de proteasa de serina, coagulación, fibrinolisis, fijación del complemento, remodelado de la matriz, expresado en placenta
ST3GAL6	sialiltransferasa 10	metabolismo de amino azúcares, glicosilación de aminoácidos proteicos, metabolismo de glicolípidos, lipoilación de proteínas
ST6GALNAC5	sialiltransferasa 7E	glicosilación de aminoácidos proteicos, biosíntesis de gangliósidos
SLC12A8	familia de transportadores de solutos 12 (transportadores de sodio/fosfato/cloruro), miembro 8	actividad transportadora de aminoácido-poliamina, cotransportador 9 de catión-cloruro, posible papel en la inmunidad epitelial (psoriasis)
TCF21	factor de transcripción 21	regulación de la transcripción, desarrollo del mesodermo, encontrado en células epiteliales del riñón
TGFB2	factor de crecimiento transformante, beta 2	regulación del ciclo celular, transducción de señales, señalización célula-célula, proliferación celular, crecimiento celular
VTN	vitronectina (factor de diseminación en suero, somatomedina B, proteína S del complemento)	respuesta inmune, adhesión celular, proteína secretada, se une a ECM
ZC3H12A	tipo CCCM de dedo de cinc que contiene 12A	proteína inducida por tratamiento con MCP-I, unión a ácido nucleico, proteína hipotética de dedo de cinc

En primer lugar, se identificaron 58 genes seleccionando aquellos genes sobreexpresados ≥ tres veces en al menos siete de ocho condiciones de células madre AC/UC respecto a todas las muestras de BM y DF (FIG. 13). El filtrado en ocho de las ocho condiciones de células madre AC/UC rindió una lista similar. El segundo método de filtrado usó llamadas "ausentes" y "presentes" proporcionadas por el software Affymetrix MAS 5.0. Se creó una lista identificando

los genes ausentes en todas las condiciones BM y DF y presentes en AC-03, AC-11, UC-03, y UC-11. Las llamadas de genes en las últimas condiciones de células madre AC/UC no se estipularon.

Las dos listas se superpusieron significativamente y se combinaron. La lista combinada se recortó adicionalmente por la eliminación de (1) varios genes expresados a niveles muy bajos en la mayoría o en todas las condiciones de células madre AC/UC, y (2) genes portados en el cromosoma Y. Se confirmó que las células AC y UC usadas en este estudio eran masculinas por análisis FISH, y la BM y DF derivaban de un donante femenino. La lista resultante de 46 genes específicos de células madre AC/UC se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Genes específicos de AC/UC listados por ontología

Adhesión celular	Citoesqueleto	Desarrollo	ECM	Implicados en epitelios
AMIGO2	ACTG2	ADARB1	COL4A1	ACTG2
B4GALT6	DMD	IER3	COL4A2	C11orf9
DSC3	KRT18	IGFBP7	MATN2	COL4A1
DSG2	KRT8	IL1A	VTN	COL4A2
ICAM1	PDLIM3	IL1B		DSC3
PCDH7		MEST		DSG2
PKP2		TGFB2		F2RL1
VTN				ICAM1
Glicosilación	**Respuesta inmune**	**Proteólisis**	**Señalización**	IGFBP7
B4GALT6	ARTS-1	ARTS-1	F2RL1	IL6
ST3GAL6	CD200	CPA4	GPR126	KRT18
ST6GALNAC5	IL1A	LRAP	GPRC5B	KRT8
Transcripción	IL1B		IL1A	MATN2
C11orf9?	IL6		IL1B	PKP2
GATA6	LRAP		IL6	SLC12A8
NFE2L3	SLC12A8		RTN1	TCF21
TCF21	VTN		TGFB2	

Esta lista de 46 genes codifica una colección de proteínas que presentan un número de grupos de ontología. El grupo más altamente representado, adhesión celular, contiene ocho genes. Ningún gen codifica proteínas implicadas en la replicación del ADN o la división celular. También se listan dieciséis genes con referencias específicas a epitelios.

5.8.3 Discusión

Se identificó un patrón de expresión específico para células madre placentarias, y distinguible de las células mesenquimales derivadas de la médula ósea. A nivel operativo, este patrón incluye 46 genes que están sobreexpresados en todas las muestras de células madre placentarias respecto a todas las muestras de BM y DF.

El diseño experimental comparó células cultivadas durante periodos de tiempo en cultivo cortos, medios y largos. Para las células AC y UC, cada periodo de cultivo tiene un conjunto característico de genes expresados diferencialmente. Durante la fase de tiempo corto o temprana (AC-03 y UC-03) doscientos genes regulados al alza retroceden a la media después de ocho duplicaciones de las poblaciones. Sin estar vinculados por teoría, es probable que este patrón de expresión génica en estadio temprano se parezca al perfil de expresión de AC y UC, mientras están en el entorno placentario natural. En la placenta, estas células no se están dividiendo activamente, están metabolizando nutrientes, con señalización entre ellas, y asegurando su localización mediante el remodelado del entorno extracelular.

La expresión génica por los cultivos con una duración intermedia está definida por la rápida división celular y los genes expresados diferencialmente en este momento son bastante diferentes de los expresados diferencialmente durante la fase temprana. Muchos de los genes regulados al alza en AC-11 y UC-11, junto con BM-03 y DF-14, están implicados en la replicación cromosómica y la división celular. Sobre la base de la expresión génica, BM-03 parece biológicamente como un cultivo de duración media. En este estadio medio, la expresión génica específica del tipo celular está eclipsada por la proliferación celular. Además, casi cada gen sobreexpresado en los cultivos de duración corta de AC o UC está regulado a la baja en las condiciones de estadio medio y tardío. 143 genes estaban regulados al alza ≥ cinco veces durante esta fase altamente proliferativa, constituyendo aproximadamente el 1.7 % de los genes expresados.

Los cultivos de larga duración representan la fase final o senescente. En esta fase, las células han agotado su capacidad de dividirse, y, especialmente para AC y UC, el número absoluto de genes expresados diferencialmente está reducido de forma importante. Esto puede ser el resultado de que las células se han adaptado completamente a su entono de cultivo y una carga consecuentemente reducida para biosintetizar. Sorprendentemente, los cultivos tardíos de BM y DF no presentan este mismo comportamiento; un gran número de genes se expresan diferencialmente en BM-11 y DF-24 respecto a AC y UC y el valor normalizado de 1. AC y UC son distinguibles de BM y DF, de forma más notable, en los cultivos de larga duración.

La lista de genes específicos de células madre placentarias descrita aquí es diversa. COL4A1 y COL4A2 están regulados de forma coordinada, y KRT18 y KRT8 también parecen coexpresarse. Ocho de los genes codifican proteínas implicadas en el contacto célula a célula, tres de los cuales (DSC3, DSG2, y PKP2) están localizados en los desmosomas, puntos de contacto intercelular anclados para proteínas del citoesqueleto de filamento intermedio tales como queratina 18 y queratina 8. El contacto célula a célula firme es característico de las células epiteliales y endoteliales y no está asociado típicamente con los fibroblastos. La Tabla 3 lista 16 genes, del total de 46, característicos de las células epiteliales. Las células madre placentarias se describen generalmente como células con forma de huso pequeñas semejantes a fibroblastos. Esta morfología es típicamente distinta de BM y DF, especialmente a densidades celulares menores. También se puede indicar el patrón de expresión de CD200, que está presente en las células madre AC/UC y ausente en todas las muestras BM y DF. Además, se ha mostrado que CD200 está asociado con la tolerancia inmune en la placenta durante el desarrollo fetal (véase, p. ej., Clark *et al*, *Am. J. Reprod. Immunol*. 50(3): 187-195 (2003)).

Este subconjunto de genes de 46 genes constituye un conjunto de biomarcadores moleculares que distingue las células madre AC/UC de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea o fibroblastos.

5.9 Ejemplo 6.9: diferenciación de células madre placentarias adherentes en células osteogénicas

Este ejemplo describe los resultados de experimentos que demuestran la capacidad de las células madre placentarias de diferenciarse en células osteogénicas. Este ejemplo también demuestra la capacidad de dichas células osteogénicas de mineralizarse, o de contribuir a la mineralización, de un soporte apropiado *in vitro*.

5.9.1 Expresión de marcadores osteogénicos por células madre placentarias diferenciadas

Inicialmente, se evaluó la capacidad de las células madre placentarias para diferenciarse en precursores osteogénicos mediante la monitorización de la actividad fosfatasa alcalina (AP). La actividad AP es un marcador temprano usado comúnmente para la formación ósea. Véase, *p. ej.*, Kasten *et al*, 2005, *Biomaterials* 26:5879- 89.

5.9.1.1 Reactivos

El DMEM-LG, suplemento de insulina-transferrina-selenio-G (ITS), penicilina-estreptomicina (P/S), ensayo fluorescente de ADNds PicoGreen se adquirieron en Invitrogen (Eugene, OR). MCDB201, ácido linoleico, dexametasona, ácido L-ascórbico, y factor de crecimiento epidérmico se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO). El suero fetal bovino (FBS) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas se obtuvieron de Hyclone (Logan, UT) y R&D Systems (Minneapolis, MN), respectivamente. Las células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea criopreservadas, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (designado en este Ejemplo como "basal"), y medio de diferenciación osteogénica (OS) se adquirieron en Cambrex (East Rutherford, NJ). Véase también la Sección 5.5.4, anteriormente.

5.9.1.2 Cultivo celular

Las células madre placentarias adherentes se aislaron de la placenta por uno de varios métodos incluyendo disrupción física de tejido de varios sitios anatómicos diferentes en la placenta. Las células madre placentarias adherentes se establecieron y se subcultivaron a 5 x 10^3 células/cm^2 en medio Anthro1B (60 % de DMEM-LG, 40 % de MCDB201, 2 % de FBS, 1X P/S, 180 ng/mL de ácido linoleico, dexametasona 0.05 µM, ácido L-ascórbico 0.1 mM, 10 ng/mL de factor de crecimiento derivado de plaquetas y 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico). Las MSC de médula

ósea se subcultivaron en medio basal a 5 x 10^3 células/cm^2. Para los estudios experimentales en poliestireno de cultivo tisular, las células madre placentarias y/o las células madre mesenquimales se sembraron bien en medio basal o Anthro1B a 5 x 10^3 células/cm^2 después se mantuvieron bien en medio Anthro1B o se indujeron con OS durante hasta 5 semanas; las células se alimentaron bisemanalmente con medio fresco. Para los estudios en soportes tridimensionales, las células madre placentarias en un volumen de 100 µl de medio Anthro1B se sembraron (2.5 x10^5 células/soporte) en soportes de fosfato de calcio (CaP, BD Biosciences, San Jose CA) o β-fosfato tricálcico (TCP, Therics, Akron, OH; VITOSS®, Orthovita, Inc.; Malvern, PA; HEALOS™II; DePuy Spine, Inc.; Raynham, MA). Después de 1-2 horas de incubación a 37 ºC, los pocillos que contenían los soportes se suplementaron con 180 µl de medio. Después de 3-4 días, la mitad de las muestras se mantuvo en medio Anthro1B y la otra mitad de las muestras se indujo con medio OS. El medio se cambió bisemanalmente.

5.9.1.3 Ensayo de la fosfatasa alcalina

La actividad fosfatasa alcalina (AP) en los lisados celulares se determinó usando un ensayo colorimétrico (Cell Biolabs, San Diego, CA), que mide la formación del producto p-nitrofenol; la actividad AP se normalizó respeto a los µg de ADN (para tener en cuenta cualquier diferencia en el número de células) usando el ensayo fluorescente ADNds PicoGreen (Invitrogen, Eugene, OR). Para averiguar la actividad AP de las células cultivadas en soportes, se lavaron las construcciones célula-soporte con PBS, se sumergieron en tampón de lisis celular, se aplastaron con una punta de pipeta, y se centrifugaron a 12 000g. Los sobrenadantes se analizaron entonces para determinar la actividad AP y el contenido de ADN como se ha descrito anteriormente.

5.9.1.4 Resultados y discusión

Las células madre placentarias y las células madre mesenquimales se sembraron bien en medio basal (Cambrex) o medio Anthro1B, después se mantuvieron bien en medio basal, OS, o Anthro1B durante 3 semanas (las células sembradas en medio basal e inducidas con medio OS se designan como "basal-OS" en la Figura 14). Como se muestra en las Figuras 14A y 14B, las células sembradas y mantenidas en medio basal muestran la actividad AP más baja, como se esperaba, mientras las células sembradas en medio basal e inducidas con medio OS muestran niveles comparativamente más altos de actividad AP. De forma interesante, las células sembradas y mantenidas en Anthro1B muestran los niveles más altos de actividad AP, incluso más altos que las células sembradas en medio Anthrol1B e inducidas con medio OS. Así, este experimento demostró que las PDAC pueden diferenciarse en células precursoras osteogénicas cuando se cultivas en el medio apropiado.

5.9.2 Caracterización funcional de la diferenciación de las PDAC en células osteogénicas

Este ejemplo describe los resultados de experimentos para evaluar las capacidades funcionales de las células osteogénicas diferenciadas a partir de células madre placentarias. Específicamente, se evaluó la capacidad de las células osteogénicas para depositar una matriz mineralizada. Las células madre placentarias se prepararon y cultivaron como se describe en el Ejemplo 6.9.1, anteriormente, excepto en que las células madre placentarias se sembraron y cultivaron en medio Anthro1B durante 3 días, después se mantuvieron bien en medio Anthro1B o se indujeron con medio OS durante 3 semanas. La mineralización se evaluó por tinción de von Kossa, un ensayo de calcio, y visualización por electromicrografía de barrido (SEM).

5.9.2.1 Tinción de von Kossa

Los especímenes se tiñeron para mineral por el método de von Kossa. En particular, se fijaron capas celulares con 10 % de formalina durante 10 minutos, se incubaron con 5 % de nitrato de plata bajo luz ultravioleta durante 20 minutos, se lavaron con agua desionizada, se incubaron con 5 % de tiosulfato durante 5 minutos, y se lavaron concienzudamente con agua desionizada.

5.9.2.2 Ensayo de calcio

Se lavaron dos veces las monocapas celulares con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se rasparon de la placa en HCl 0.5N. El calcio acumulado se extrajo del componente celular incubando toda la noche a 4 ºC en un agitador orbital, seguido de centrifugación a 2000g durante 10 minutos. El sobrenadante se usó para la determinación del calcio usando un kit de cuantificación de calcio de Stanbio Laboratory (Boerne, TX). Los niveles de calcio se normalizaron respecto a la proteína celular total para tener en cuenta cualquier diferencia en el número de células.

5.9.2.3 Análisis SEM

Las muestras para SEM se fijaron en 10 % de formalina durante 15 minutos, se lavaron con PBS, y se deshidrataron en una serie gradual de etanol (20, 40, 60, 80, y 100 %). Los soportes se incluyeron en parafina después de la deshidratación con etanol para facilitar el seccionamiento. Después del seccionamiento, las muestras se incubaron en xileno y se deshidrataron en una serie gradual de etanol como se ha descrito anteriormente. Todos los especímenes

se recubrieron entonces por rociado con oro y se analizaron usando SEM de emisión de campo JEOL JSM- 6400F (Evans Analytical Group, East Windsor, NJ).

5.9.2 4 Resultados y discusión

Como se muestra en la Figura 15A, las células madre placentarias adherentes inducidas con medio OS muestran evidencia de depósitos de calcio por la tinción de von Kossa; estos depósitos no se observaron en células mantenidas en medio Anthro1B. Para cuantificar estos niveles de matriz mineralizada, se determinó el calcio asociado con las monocapas celulares. Como se muestra en la Figura 15B, se recuperó tres veces más de calcio de las capas celulares inducidas con medio OS comparado con las cultivadas en medio Anthro1B. Junto con los datos de la tinción de von Kossa, los resultados de la extracción de calcio muestran que las células madre placentarias inducidas con medio OS forman una matriz mineralizada. Para visualizar la matriz mineralizada con una alta resolución, las muestras de las células madre placentarias bien mantenidas en medio Anthro1B (Figura 16A) o inducidas con medio OS (Figura 16B) se sometieron a análisis por SEM.

Los depósitos de matriz mineralizada son claramente evidentes en células madre placentarias inducidas con medio OS, mientras no se observan dichas acumulaciones de depósitos mineralizados en las células madre placentarias cultivadas en medio Anthro1B. El mapeo elemental de los depósitos en la Figura 16B por análisis con rayos X confirma que estos nódulos están compuestos por calcio y fosfato.

La ausencia aparente de correlación entre los resultados en la Figura 14 (actividad AP incrementada en presencia de medio Anthro1B) y las Figuras 15 y 16 (ausencia de mineralización en presencia de medio Anthro1B) puede explicarse por el hecho de que Anthro1B no contiene β-glicerofosfato, que se requiere como una fuente de fosfato para la mineralización de la matriz. La dexametasona y el ácido ascórbico, que están presentes en el medio Anthro1B, así como el medio OS, son inductores comunes de la diferenciación osteogénica en las células madre. Véase, p. ej., Sun *et al*, 2006, *Biomaterials* 27:5651-7. El β-glicerofosfato se incluye habitualmente en el medio de diferenciación osteogénica como una fuente de fosfato para permitir la mineralización de la matriz mediada por células; en general, no se reconoce como un inductor *per se* de la diferenciación osteogénica. Los datos de la actividad AP sugieren que las células madre placentarias sembradas y mantenidas en Anthro1B tienen el potencial más alto de diferenciación osteogénica; es bastante probable que la mineralización no se observara en las células madre placentarias cultivadas en medio Anthro1B debido a la ausencia de β- glicerofosfato.

5.9.3 Diferenciación de las PDAC en un soporte tridimensional

Este ejemplo describe la diferenciación de las células madre placentarias en células osteogénicas en un sustrato tridimensional. Como los biomateriales basados en fosfato de calcio y apatito se han aplicado clínicamente para el tratamiento de fracturas y defectos óseos, se eligieron dos soportes cerámicos disponibles comercialmente para evaluar la unión de las células madre placentarias y la funcionalidad osteogénica en soportes tridimensionales (3D). Las células madre placentarias y las células madre mesenquimales se sembraron en soportes y se evaluó su capacidad de unirse a y permanecer adherentes en los soportes durante el cultivo in vitro de larga duración. Como se muestra en la Figura 17, las células madre placentarias, así como las células madre mesenquimales, se unieron preferentemente a β-fosfato tricálcico (TCaP) comparado con los soportes de fosfato de calcio (CaP), mostrando las células madre placentarias y las células madre mesenquimales niveles similares de unión a los soportes TCaP. Además, a lo largo de la duración del curso de tiempo, hay consistentemente más células (tanto células madre placentarias como células madre mesenquimales) presentes en el soporte TCaP frente a CaP. Sobre la segunda semana de cultivo, tanto las células madre placentarias adherentes como las células madre mesenquimales no fueron ya detectables en los soportes CaP. Estos datos están apoyados por el análisis de consumo de oxígeno en el medio de cultivo usando placas sensoras de oxígeno. Conjuntamente, estos resultados sugieren, al menos en determinadas condiciones, que los soportes TCaP son más preferibles para el mantenimiento de la viabilidad de PDAC que los soportes CaP.

Para evaluar la diferenciación osteogénica en los soportes, se monitorizó la actividad AP de las células cultivadas en los soportes en un ensayo de AP realizado como se ha descrito anteriormente. Las células madre placentarias y las células madre mesenquimales se sembraron en medio Anthro1B, después se mantuvieron bien en medio Anthro1B o medio OS durante la duración del experimento. Como se muestra en la Figura 18, las células madre placentarias en soportes TCaP muestran una actividad AP similar ya se cultiven en medio Anthro1B o medio OS, mientras las MSC en soportes TCaP presentaron una mayor actividad AP en medio Anthro que las células cultivadas en medio OS. Estos resultados son consistentes con los datos de actividad AP obtenidos en superficies 2D, concretamente que los factores presentes en el medio Anthro1B pueden estar estimulando la actividad AP a niveles similares que el medio OS. Tanto para MSC como PDAC, no se detectó actividad AP en las células sembradas en soportes CaP.

Para evaluar funcionalmente la formación de matriz ósea de las células madre placentarias en soportes 3D, las células madre placentarias adherentes sembradas en soportes y se cultivaron bien en medio Anthro1B u OS durante 3-5

semanas, se sometieron a análisis por SEM. Como se muestra en la Figura 19, la SEM del soporte TCaP que se cultivaron en ausencia de las células mostró una superficie altamente porosa (indicado con una flecha) por la presencia de poros abundantes. Los soportes cultivados bien con células madre placentarias o células madre mesenquimales muestran una falta de porosidad en la superficie, lo que sugiere que las células están formando una monocapa que consiste en una o ambas bicapas celulares o proteínas de la matriz extracelular rodeando el soporte.

Para elucidar si se estaba produciendo la formación de matriz ósea mineralizada en el interior de los soportes por las células, se analizaron secciones transversales de la construcción de célula-soporte TCaP por SEM a una alta resolución (5000x). Como se muestra en la FIG. 19, los soportes cultivados en ausencia de las células se caracterizaron por bordes afilados del cristal de TCaP que compone el soporte. Sin embargo, los soportes sembrados con células madre placentarias o células madre mesenquimales carecen de estos bordes afilados y en su lugar están decorados con estructuras nodulares, que se parecen mucho a las observadas en la FIG. 17, lo que sugiere la formación de matriz ósea mineralizada tanto por las células madre placentarias como por las células madre mesenquimales en soportes TCaP.

5.10 Ejemplo 10: diferenciación de las células madre placentarias en precursores osteogénicos

Este ejemplo describe los resultados de experimentos que evalúan la diferenciación de las células madre placentarias aisladas por perfusión en células precursoras osteogénicas. Las células se aislaron a partir de placenta humana por perfusión según el Ejemplo 6.3.

Después de la recogida, las células de perfusado placentario humano (HPP) se cultivaron en medio DMEM que contenía 10 % de FBS u OS durante 10 días en VITOSS® (Orthovita, Inc.; Malvern, PA). Las células se sedimentaron por centrifugación a 1200 rpm durante 5 min. Después de la retirada del fluido remanente de los sedimentos celulares, las células se resuspendieron en 20 µl de PBS-2 % de suero bovino fetal a los números de células designados (25 k, 50 k o 100 k). Los soportes se cortaron entonces en partes de 2x3x5 mm^3 y se pusieron en los pocillos de placas de 96 pocillos. Las suspensiones celulares se cargaron directamente en los soportes y se incubaron a 37 ºC con la presencia de 5 % de CO_2 durante 30 min seguido de dispensación de 200 µl de medio de Diferenciación Osteogénica Cambrex (No. de cat. PT-3002) para sumergir las células-soportes. Para el ensayo de viabilidad celular, los soportes cargados con células se transfirieron al Sistema Biosensor de Oxígeno BD (BD Biosciences, No. de cat. 353830) y se sumergieron con 200 µl de medio de Diferenciación Osteogénica Cambrex.

El potencial osteogénico se evaluó entonces tiñendo y monitorizando la actividad AP. En particular, las células se tiñeron con rojo de alizarina según técnicas convencionales para detectar la presencia de calcio. Como se muestra en la FIG 20, tanto las células madre como las MSC depositaron una matriz mineralizada que contenía calcio en medio OS, pero no en DMEM.

Los ensayos de AP se realizaron después de cultivar en OS durante diez días. Para hacer esto, las HPP en los soportes se lisaron en 100 µl de PBS que contenía 0.2 % de Tritón X-100 congelando y descongelando dos veces. Se usaron 5 µl de lisado celular para medir la actividad fosfatasa alcalina usando el kit de Ensayo de Fosfatasa Alcalina QuantiChrom de BioAssay Systems (No. de cat. DALP-250) como se indica por las directrices del vendedor. Los resultados de los ensayos se presentan en la Figura 21, que muestra que tanto las MSC como las HPP presentaron actividad AP después de 10 días de cultivo en medio OS. Así, estos experimentos demuestran que la fracción de células madre que contiene células obtenidas como se ha descrito anteriormente también tenía la capacidad de diferenciarse en células precursores osteogénicas.

5.11 Ejemplo 11: modelos in vivo para la reparación ósea con composiciones que comprenden células madre placentarias

Este ejemplo describe experimentos que se realizan con el fin de evaluar el tratamiento de defectos óseos con composiciones que comprenden células madre placentarias. Varios modelos de enfermedad ósea están adaptados para evaluar la aplicación de dichos tratamientos a diferentes enfermedades óseas.

Para modelar el defecto craneal bilateral, se crea quirúrgicamente un defecto de 3 mm x 5 mm en cada lado del cráneo de ratas macho atímicas. Los defectos se tratan solo con matriz, matriz en combinación con PDAC, y matriz en combinación con HPP. Las cantidades de PDAC se varían para evaluar la dependencia de la dosis de los diferentes tratamientos. También se evalúan diferentes materiales de la matriz con el fin de ensayar los efectos de diferentes combinaciones de matriz y células madre.

Se asignan seis ratas a cada grupo de tratamiento y los defectos se rellenan con la combinación designada de matriz y células. A las cuatro semanas, se recoge el suero y las ratas se sacrifican. El suero se ensaya para detectar la reacción inmunológica a los implantes. Los cráneos de las ratas se recogen para microradiografía y se ponen en 10 % de NBF.

Las bóvedas craneales se procesan para inclusión en parafina y seccionamiento. Las secciones histológicas de corona de las bóvedas craneales se tiñen con tinción de toluidina según técnicas convencionales. El crecimiento óseo interno en el defecto y el remanente de vehículo de matriz se evalúan según una escala de 0 a 4, siendo cuatro la mayor cantidad de crecimiento interno. También se evalúan la inflamación y la fibrosis.

El tratamiento de las lesiones óseas que se producen por metástasis de cáncer puede evaluarse según una adaptación del procedimiento de Bäuerle *et al*., 2005, *Int. J. Cancer* 1 15: 177-186. Brevemente, se inducen lesiones osteolíticas específicas de sitio en ratas desnudas por inyección intra-arterial de células de cáncer de mama humano en un vaso anastomosante entre las arterias femoral e ilíaca. Las metástasis se tratan entonces bien con terapias anticancerosas convencionales (p. ej., quimioterapéutica, radiológica, inmunológica, u otra terapia) o se retiran quirúrgicamente. A continuación, las lesiones remanentes de las metástasis de cáncer se rellenan con diferentes combinaciones de matriz como se ha descrito anteriormente. Después de un periodo de tiempo apropiado, como se determina por monitorización radiológica de los animales, los animales se sacrifican. Se evalúan la respuesta inmunológica frente a la matriz, la inflamación, fibrosis, grado de crecimiento óseo interno, y la cantidad de vehículo de matriz.

Las referencias adicionales que describen modelos de enfermedad ósea que pueden usarse o adaptarse para evaluar la eficacia de las composiciones que comprenden células madre placentarias para tratar defectos óseos incluyen Mitsiades *et al*., 2003, *Cancer Res*. 63:6689-96; Chakkalakal *et al*, 2002, *Alcohol Alcoholism* 37: 13-20; Chiba *et al*, 2001, *J. Vet. Med. Sci.* 63:603-8; Garrett *et al*, 1997, *Bone* 20:515-520; y Miyakawa *et al*, 2003, *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 313:258- 62.

5.12 Ejemplo 12: producción de colágeno mineralizado a partir de colágeno de placenta humana

Una disolución de colágeno placentario humano (HPC) a 4 °C a ~3 mg/ml se combinó con un tampón neutralizante (Na_2HPO_4 200 mM, pH 9.2) en una relación 85:15 para proporcionar una concentración final de Na_2HPO_4 de 30 mM y un pH de 7.2. Se consiguieron ajustes ligeros del pH con la adición de NaOH o HCl 1 N mientras se agitaba. Una vez se ajustó el pH, la agitación se paró y la reacción se sometió a una rampa a 1 ºC /min hasta 32 ºC. La reacción se mantuvo isoterma durante 20-24 horas y el colágeno fibrilar se aisló por centrifugación. El colágeno se resuspendió 3x con disolución salina tamponada con fosfato (PBS, Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 130 mM, pH 7.4) y se centrifugó para aislar el colágeno. El colágeno fibrilar final lavado se resuspendió hasta 10 mg/ml en PBS y se almacenó a 4 °C hasta que se usó. La fibrilación de HPC reconstituye el colágeno soluble como fibrillas cortas y fibras largas como se muestra en la Figura 22a.

5.12.1 Mineralización de las fibrillas de colágeno

Para mineralizar el colágeno, se dispersó $Ca(OH)_2$ a 199.9 mmoles/L, mientras se preparaba una disolución 59.7 mM de H_3PO_4. El $Ca(OH)_2$ y el H_3PO_4 se combinaron conjuntamente en una relación 2:1, respectivamente, y el pH se ajustó a 9 en un recipiente de reacción con camisa de agua. Esto produce una relación 1.67 de Ca/P. La reacción se agitó vigorosamente mientras la temperatura se mantuvo a 40 ºC y el pH se mantuvo a 9 por un baño de agua circulante y una unidad de titulación automática, respectivamente. El colágeno fibrilar en PBS se añadió lentamente a la mezcla de reacción y el pH volvió a 9. La relación final de mineral a colágeno fue 80:20. La reacción se agitó vigorosamente durante 18 horas y el colágeno mineralizado (MC) se aisló por centrifugación y se lavó 3 veces con PBS. Durante la reacción de mineralización, se formó un mineral de Ca-P junto con las fibras como se muestra en la electromicrografía presentada como Figura 22b. El rendimiento final de la reacción fue alto (>80 %), y la relación final de mineral/colágeno del material estuvo cerca de la relación de entrada de mineral/colágeno como se determina usando TGA (Figura 23).

5.12.2 Entrecruzamiento del material compuesto

El colágeno mineralizado (MC) se resuspendió hasta aproximadamente 2.5 mg/ml de colágeno en PBS y se puso en un recipiente de reacción con camisa de agua. El pH se ajustó a 9.5 y se mantuvo constante a lo largo de la reacción con una unidad de titulación automática, mientras la temperatura se mantuvo constante a 25 ºC con un baño de agua circulante. Se añadió butano diol digicidil éter (BDDE) a una concentración final de 50 mM. La reacción se agitó vigorosamente durante 24 horas, momento en el cual el producto se aisló por centrifugación, se lavó una vez con PBS, y se resuspendió en PBS con glicina 0.5M (pH 10) para apantallar cualesquiera grupos epóxido residuales que no habían reaccionado. La reacción se agitó vigorosamente a 25 ºC durante 24 horas y después se lavó 3 veces con PBS. Se usó centrifugación para aislar el colágeno mineralizado entrecruzado (CMC). Las formulaciones de CMC se caracterizaron por microscopía óptica y electrónica de barrido, Análisis Termo Gravimétrico (TGA), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) difractómetro de rayos X (XRD), y Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

El entrecruzamiento se confirmó por un incremento en la temperatura de desnaturalización del colágeno de ~50 a ~70 ºC como se determina por DSC. El material entrecruzado tenía más integridad mecánica que el material no entrecruzado y apareció más fibroso cuando se examinó por microscopía estéreo y microscopía electrónica de barrido

(SEM). La FTIR indicó la presencia de un mineral de fosfato de calcio carbonatado. La XRD confirmó que el mineral es un hidroxiapatito poco cristalizado.

5.13 Ejemplo 13: crecimiento de PDAC en una matriz de colágeno planetario humano mineralizado

Este Ejemplo describe los resultados de experimentos que evalúan la capacidad de las células madre placentarias adherentes de unirse a y crecer en una matriz de HPC mineralizado. En estos experimentos, los CMC producidos como se ha descrito anteriormente se esterilizaron con reactivos antibióticos y antimicóticos. Las muestras húmedas se cargaron en transpocillos para estudios de citotoxicidad no de contacto usando células madre placentarias en un ensayo estándar de citotoxicidad de lactosa deshidrogenasa (LDH) según las instrucciones del fabricante. La LDH liberada en el medio de cultivo se correlacionó con citotoxicidad.

A continuación, el CMC preparado como se ha descrito anteriormente se usó para estudios de adhesión y proliferación de PDAC. Las células madre placentarias se sembraron en CMC como se ha descrito anteriormente. Los números de las células PDAC se analizaron usando un ensayo de ADN PicoGreen a 1, 5 y 7 días (Molecular Probes; Eugene, Oregón). Las PDAC mostraron una producción de LDH similar cuando se expusieron a CMC que cuando se expusieron a poliestireno de cultivo tisular (TCPS), lo que indica una baja citotoxicidad de los CMC. Las PDAC también se unieron en mayores números a CMC que al colágeno mineralizado no entrecruzado a todas las densidades de siembra ensayadas. Siete días después de la siembra, esta tendencia continuó, teniendo las células madre placentarias los mayores números de células en CMC.

5.14 Ejemplo 14: reparación de defectos craneales usando células madre placentarias y matriz implantable

La ingeniería tisular usando células madre está surgiendo como una alternativa prometedora al trasplante de tejidos u órganos. Las células madre nuevas aisladas de placenta postparto (Células Adherentes Derivadas de Placenta, PDAC) tienen características y fenotipo de células madre multipotenciales. Las PDAC constituyen una fuente importante y no controvertida de células madre/progenitoras que podrían usarse como una opción terapéutica para la reparación de tejido dañado o enfermo. En el presente estudio, investigamos el comportamiento osteogénico de las PDAC *in vitro* e *in vivo*.

Métodos

Estudio *in vitro*: las células madre placentarias se obtuvieron de la placenta por disrupción física de tejido de diferentes sitios anatómicos, se sembraron en medio basal, y después se indujeron con medio de diferenciación osteogénica (OS) como se ha descrito anteriormente. La actividad de osteogénesis *in vitro* de las PDAC se evaluó por la actividad fosfatasa alcalina (AP) y la mineralización de la matriz extracelular se detectó por tinción con Rojo Alizarina. La carga y viabilidad de las células madre placentarias en soportes tridimensionales se determinó usando un ensayo de ADN y en ensayo luminiscente CELLTITER GLO®, respectivamente.

Estudio *in vivo*: las células madre placentarias se cargaron en soportes (bien VITOSS® Orthovita o HEALOS™ DePuy) y se cultivaron durante hasta 1 hora *in vitro* para formar construcciones de células/soporte para implante. Para el modelo ectópico, las construcciones de VITOSS® cargadas con células madre placentarias se implantaron subcutáneamente en 40 ratas atímicas y se recogieron 6 semanas después del implante. Los explantes se analizaron por inmunohistoquímica (IHC). Para el modelo de defecto óseo, se crearon defectos craneales bilaterales (3mm x 5mm) en 96 ratas macho atímicas Hsd:RH-Foxn^{mu} (Charles River, Wilmington, Massachusetts), y se usaron para comparar el potencial osteogénico/de reparación de las células madre placentarias + HEALOS™, la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) + HEALOS™ como control positivo, el soporte (HEALOS™) solo como un control negativo, y defectos vacíos (sin tratamiento). Las ratas tenían una edad de aproximadamente 6 semanas en el momento del estudio, y se asignaron dieciséis ratas a cada grupo. Los explantes para las condiciones experimentales se cargaron con 500 µL de una suspensión de células madre a 5 x 10^6 células por mililitro. El control positivo comprendía 5 µg de BMP-2 por 25 mg de vehículo. El control negativo comprendía HEALOS con 500 µL de medio de cultivo celular. Los explantes se recogieron a las 3 o 7 semanas después del implante, y se analizaron con microradiografía, densidad de tejido mineralizado (software de imaginería-ImageJ 1.37v), densitómetro de rayos X Lunar PIXI, e histología. La histología se realizó en tejido óseo escindido usando las tinciones hematoxilina y eosina, azul T y vimentina.

Resultados

El comportamiento osteogénico *in vitro* de las células madre placentarias se demostró por la inducción de la actividad AP y la capacidad de las células para formar depósitos positivos para Rojo Alizarina. Resultados *in vivo*: Los explantes subcutáneos de células madre placentarias + VITOSS® mostraron tinción inmunohistoquímica positiva para osteocalcina humana, lo que demuestra el potencial osteogénico *in vivo* de las células madre placentarias. En el estudio del defecto craneal, los explantes de 3 semanas de células madre placentarias + HEALOS™ presentaron una formación ósea considerable en histología y una mineralización de alta densidad en rayos X y PIXI; estas actividades

osteogénicas se incrementaron a las 7 semanas después del implante. En las FIGS. 24-26 se representan portaobjetos de histología representativos, microradiografías, y la medición semicuantitativa de mineralización del área del defecto. Estos resultados demuestran la capacidad de las células madre placentarias, conjuntamente con un soporte, de aumentar el proceso de reparación ósea.

Conclusiones: las células madre placentarias adherentes se diferencian funcionalmente a lo largo de una ruta osteogénica dados los estímulos apropiados *in vitro*, y demuestran un aumento significativo de la reparación ósea *in vivo* comparado con las condiciones sin células. Por lo tanto, a partir de estos estudios, concluimos que las células madre placentarias pueden usarse como un terapéutico celular en las aplicaciones de ingeniería de tejido óseo con soportes apropiados.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende células madre placentarias $CD200^+$ adherentes para uso en el tratamiento de un defecto óseo en un sujeto, en donde dicha composición se formula para ser implantable o inyectable.

2. Uso de una composición en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un defecto óseo en un sujeto, en donde dicha composición comprende células madre placentarias $CD200^+$ adherentes, y en donde dicha composición se formula para ser implantable o inyectable.

3. La composición para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde dichas células madre placentarias adherentes son adicionalmente $CD73^+$ y $CD105^+$.

4. La composición para uso o el uso de las reivindicaciones 1-3, en donde dichas células madre placentarias adherentes se han subcultivado al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces.

5. La composición para uso o el uso de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho defecto óseo es una lesión osteolítica asociada con un cáncer, una fractura ósea, o una médula espinal que necesita fusión.

6. La composición para uso o el uso de la reivindicación 5, en donde dicha lesión osteolítica asociada con cáncer es una lesión osteolítica asociada con mieloma múltiple, cáncer óseo, o cáncer metastásico.

7. La composición para uso o el uso de la reivindicación 6, en donde dicho cáncer es mieloma múltiple.

8. La composición para uso o el uso de la reivindicación 6, en donde dicho cáncer es cáncer óseo.

9. La composición para uso o el uso de la reivindicación 6, en donde dicho cáncer es cáncer metastásico.

10. La composición para uso o el uso de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha composición se formula para ser inyectable en el sitio de dicho defecto óseo.

11. La composición para uso o el uso de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha composición es inyectable y se formula para administración sistémica.

12. La composición para uso o el uso de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha composición comprende al menos 5×10^6 de dichas células madre placentarias por mililitro.

13. La composición para uso o el uso de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha composición comprende un sustrato o matriz implantable.

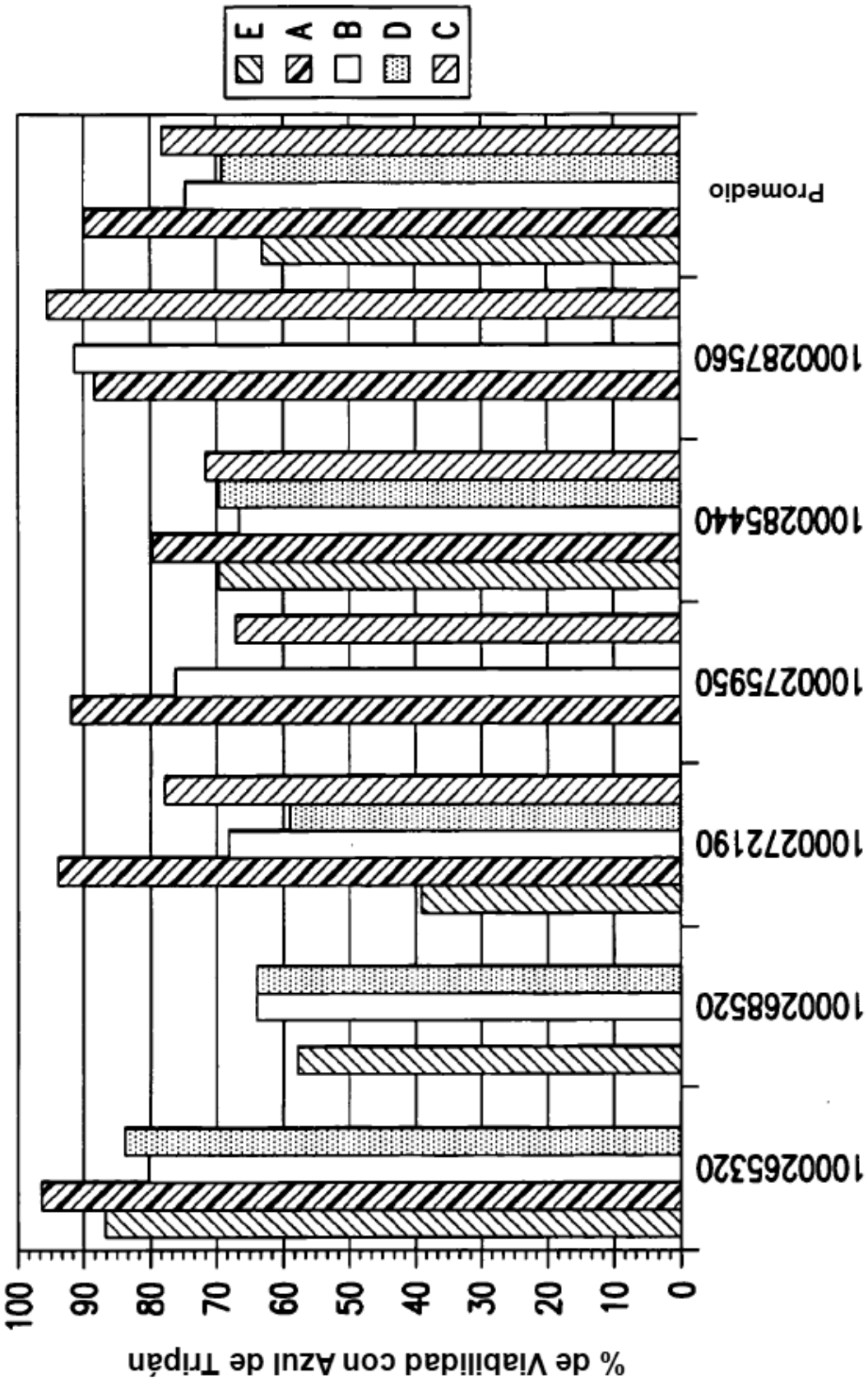

% de Viabilidad con Azul de Tripán
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
100026532 0
100026852 0
100027219 0
100027595 0
100028544 0
100028756 0
Promedio
E
A
B
D
C

FIG. 1

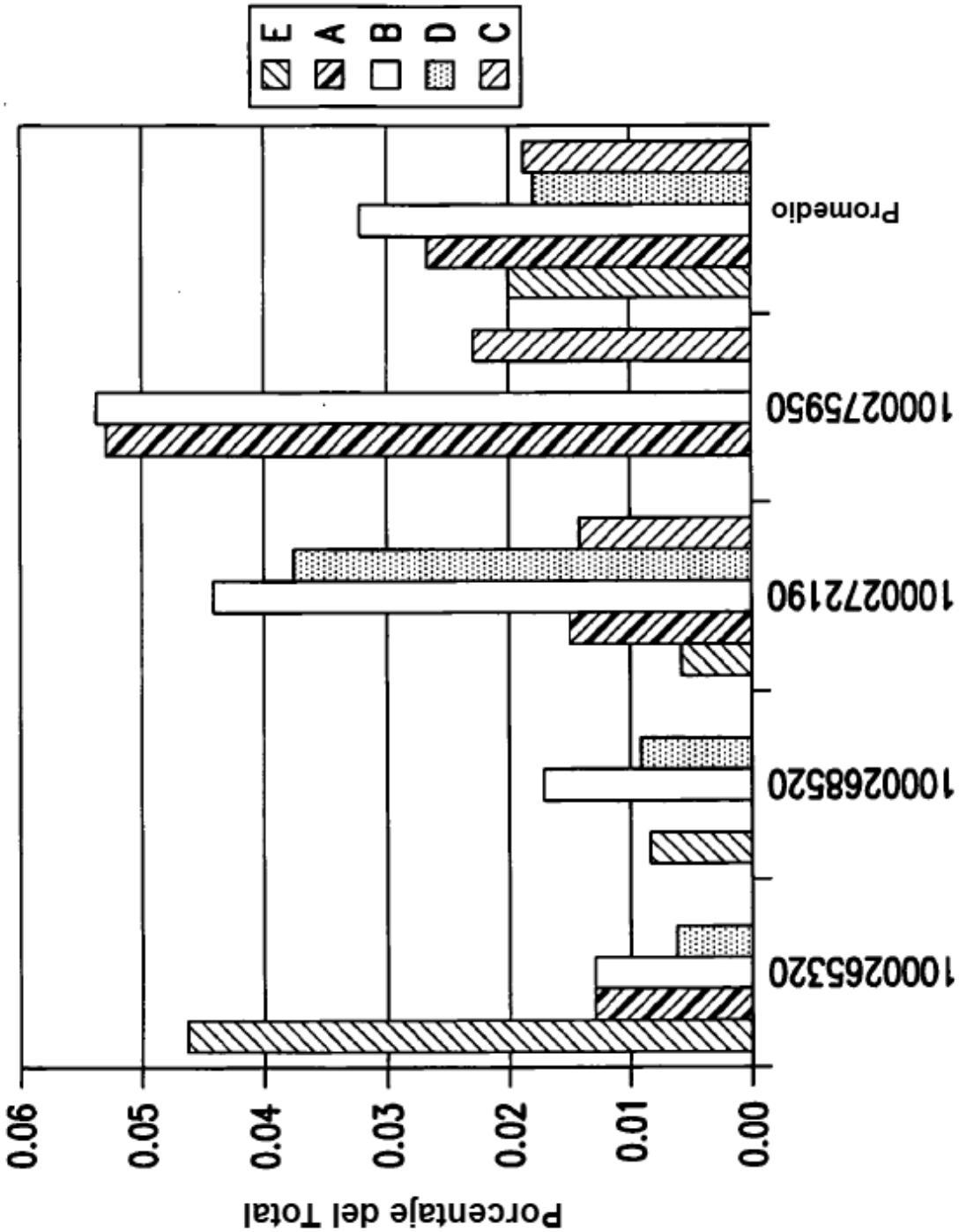

Porcentaje del Total
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
100026532 0
100026852 0
100027219 0
100027595 0
Promedio
E
A
B
D
C

FIG. 2

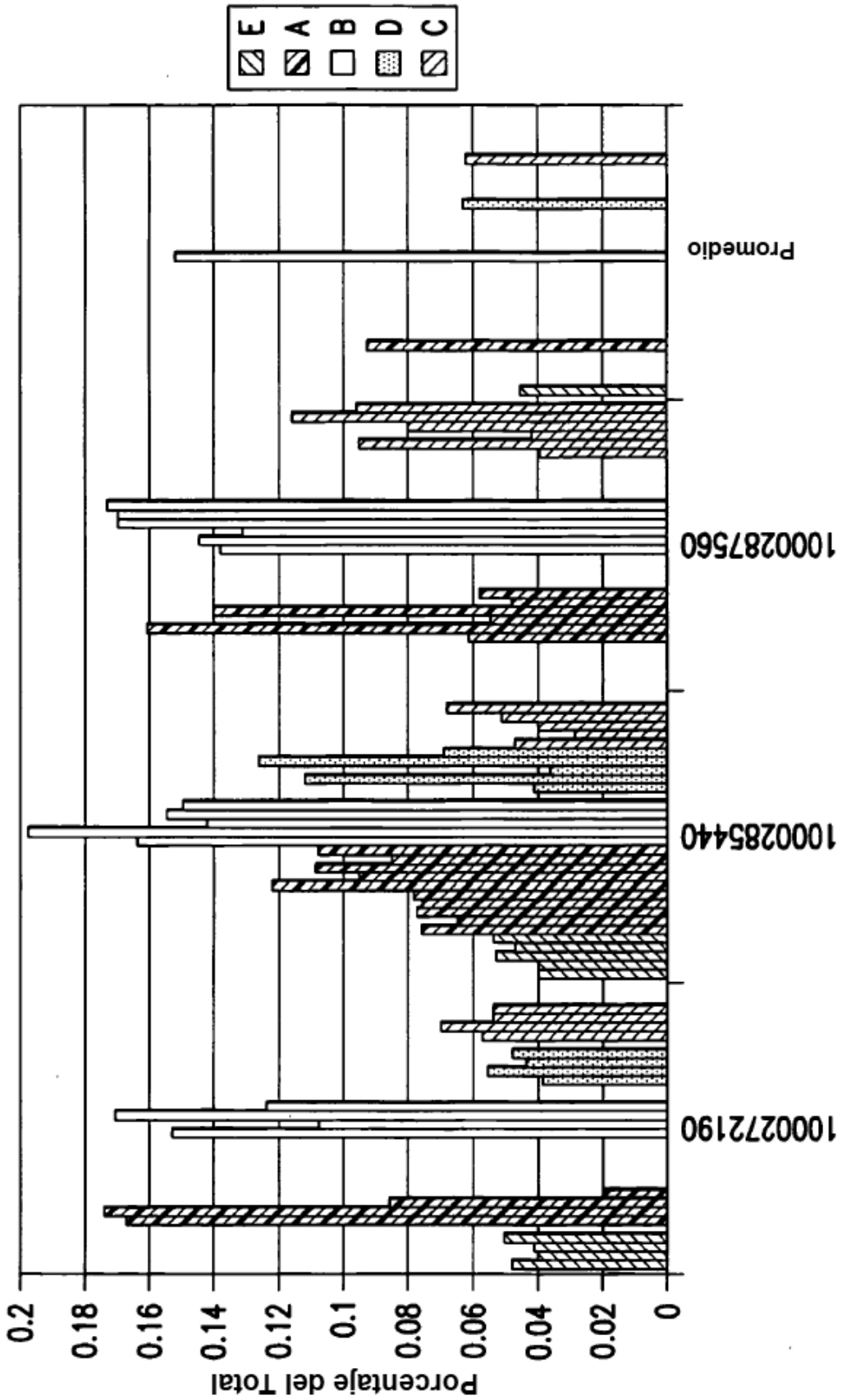

E
A
B
D
C
0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
Porcentaje del Total
100027219 0
100028544 0
100028756 0
Promedio

FIG.3

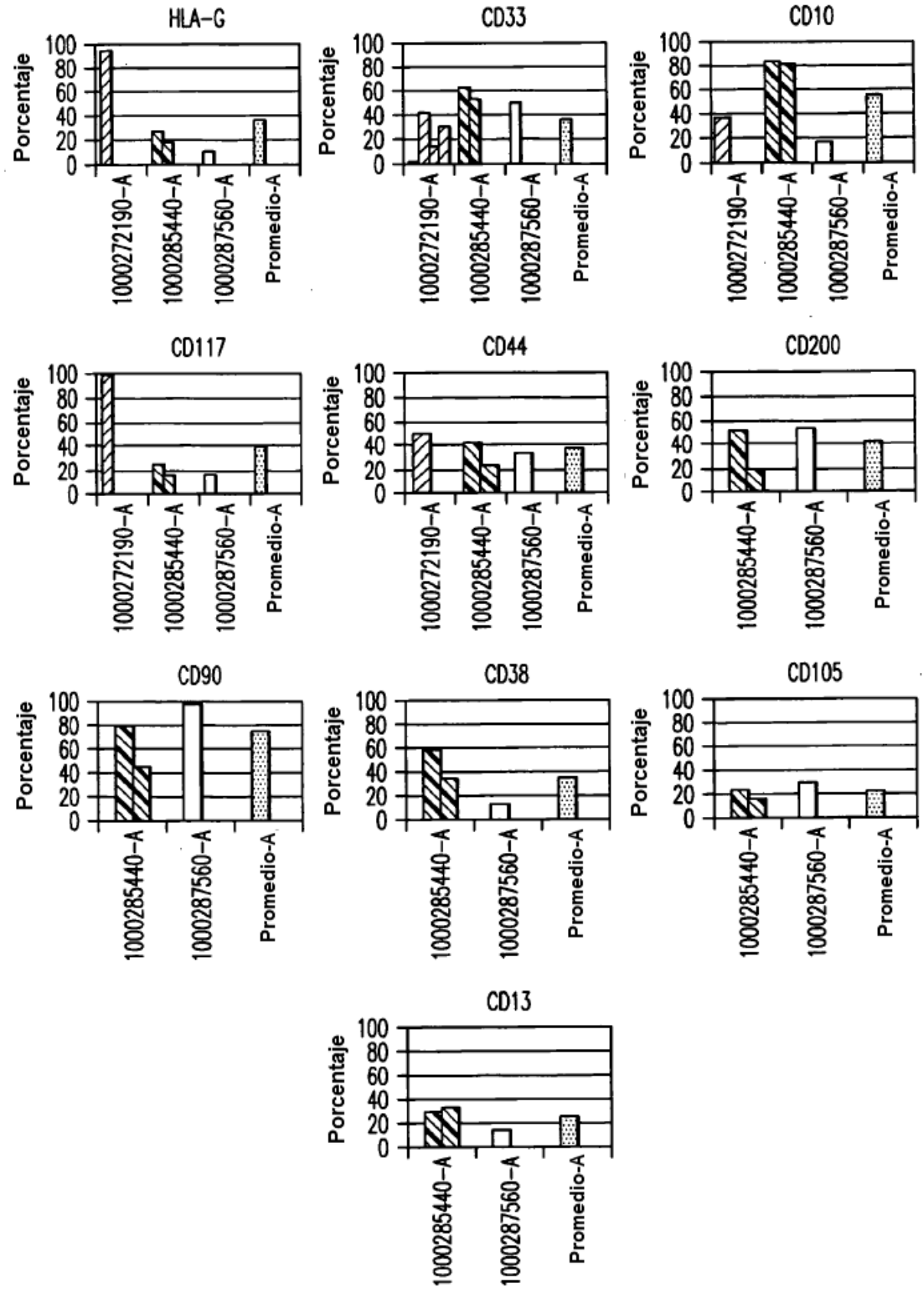

HLA-G
CD33
CD10
CD117
CD44
CD200
CD90
CD38
CD105
CD13
Porcentaje
100
80
60
40
20
0
1000272190-A
1000285440-A
1000287560-A
Promedio-A

FIG.4

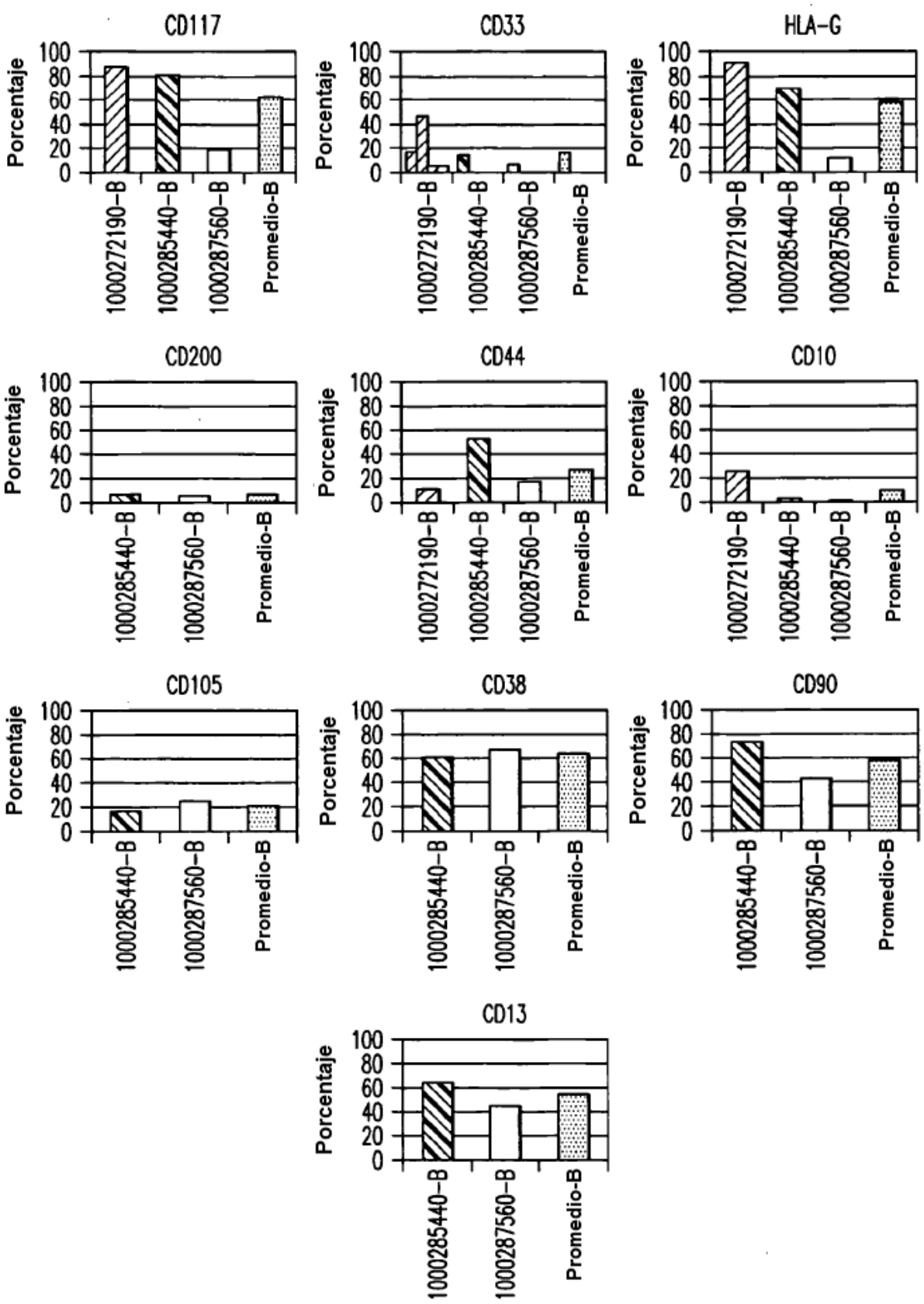

CD117
CD33
HLA-G
CD200
CD44
CD10
CD105
CD38
CD90
CD13
Porcentaje
100
80
60
40
20
0
1000272190-B
1000285440-B
1000287560-B
Promedio-B

FIG.5

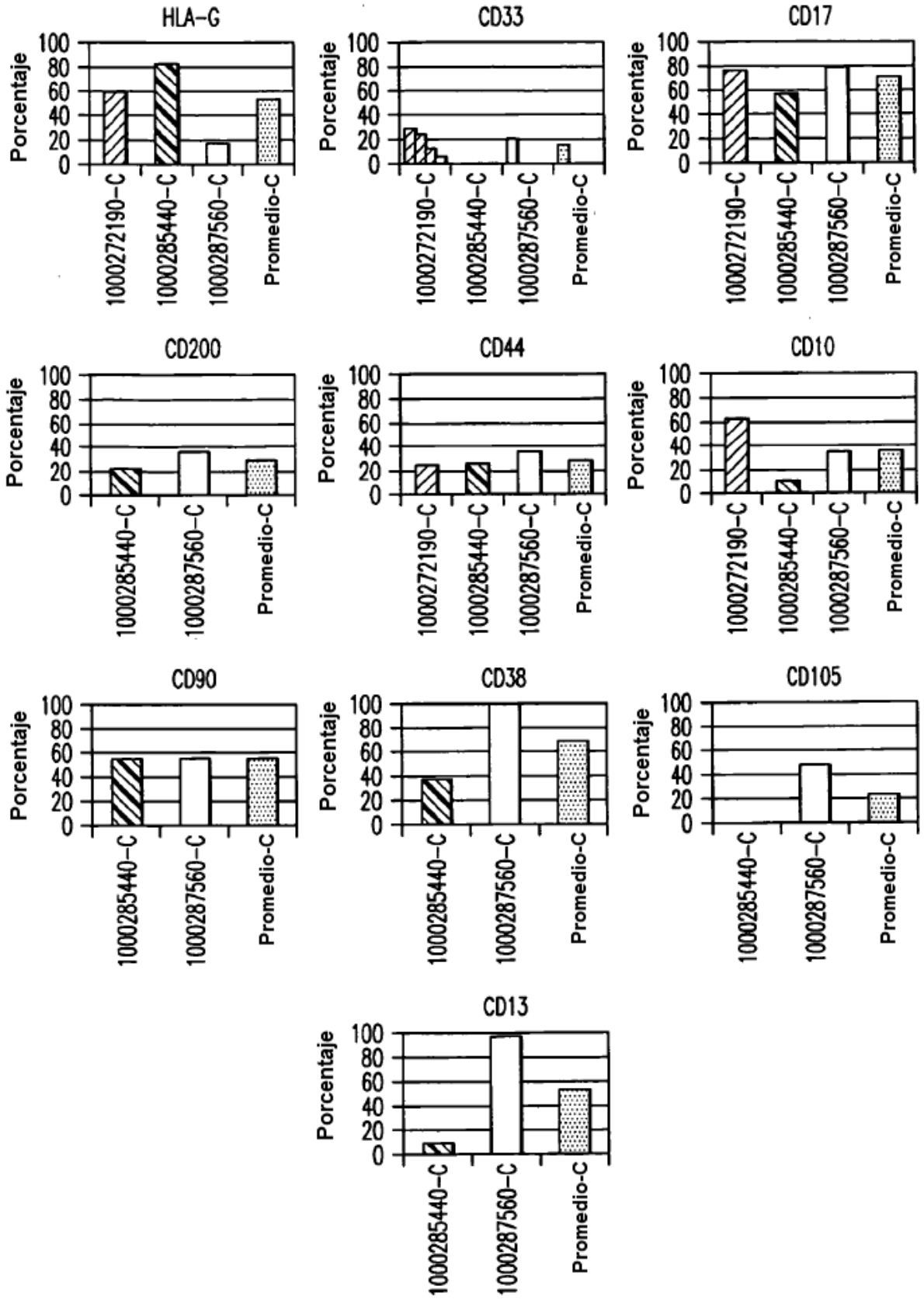

HLA-G
CD33
CD17
CD200
CD44
CD10
CD90
CD38
CD105
CD13
Porcentaje
100
80
60
40
20
0
1000272190-C
1000285440-C
1000287560-C
Promedio-C

FIG.6

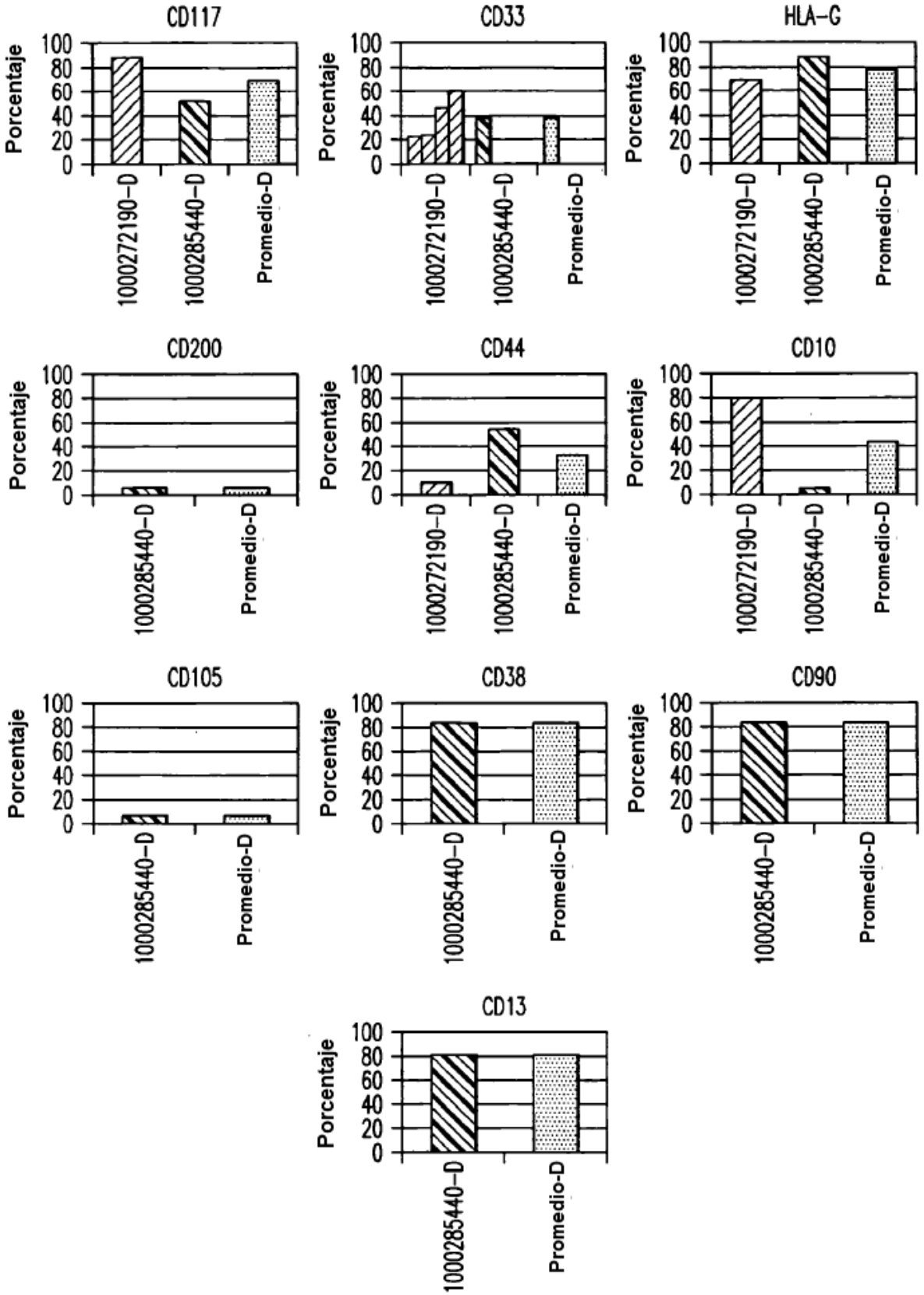

CD117
CD33
HLA-G
CD200
CD44
CD10
CD105
CD38
CD90
CD13
Porcentaje
100
80
60
40
20
0
1000272190-D
1000285440-D
Promedio-D

FIG.7

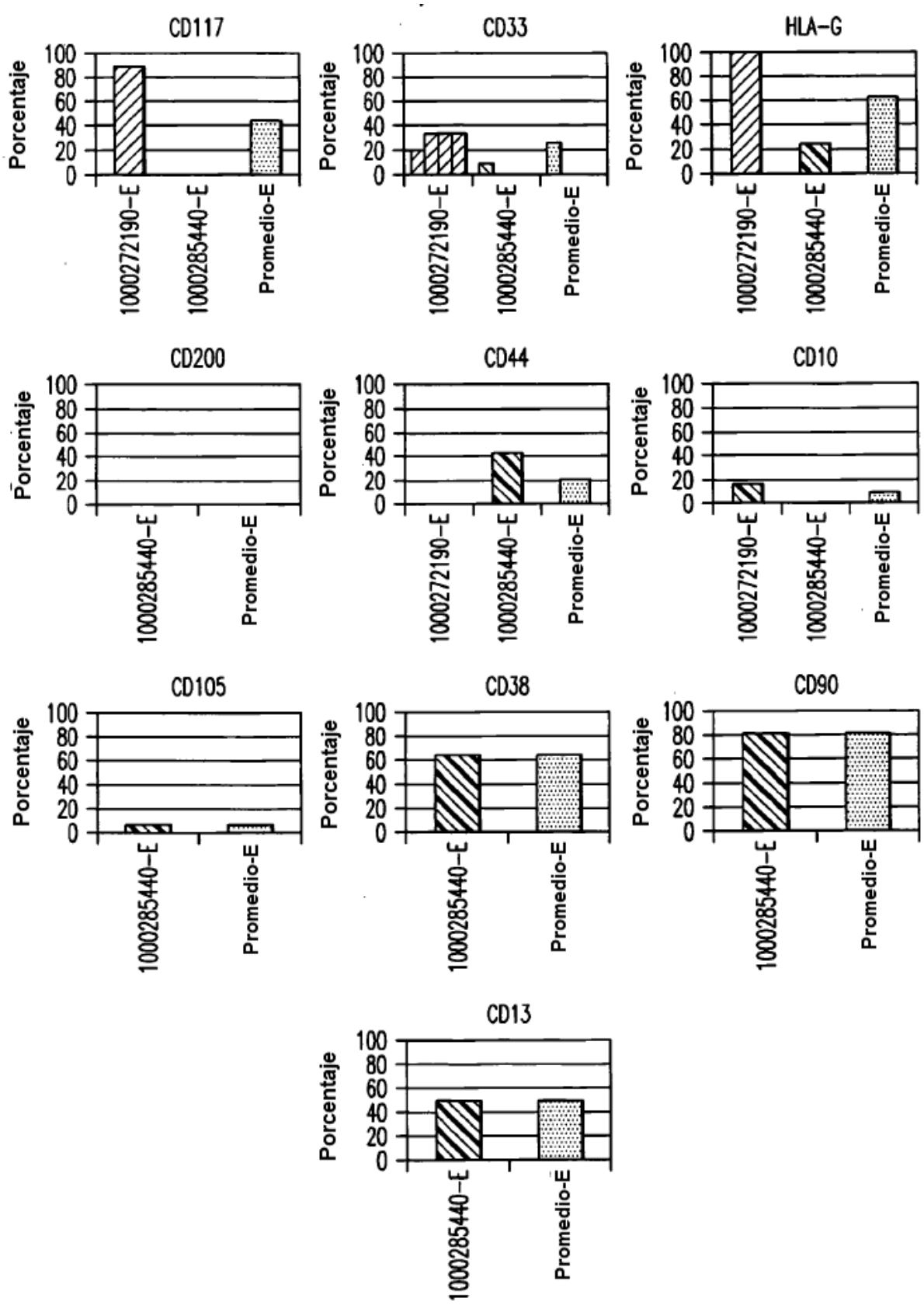

CD117
CD33
HLA-G
CD200
CD44
CD10
CD105
CD38
CD90
CD13
Porcentaje
100
80
60
40
20
0
1000272190-E
1000285440-E
Promedio-E

FIG.8

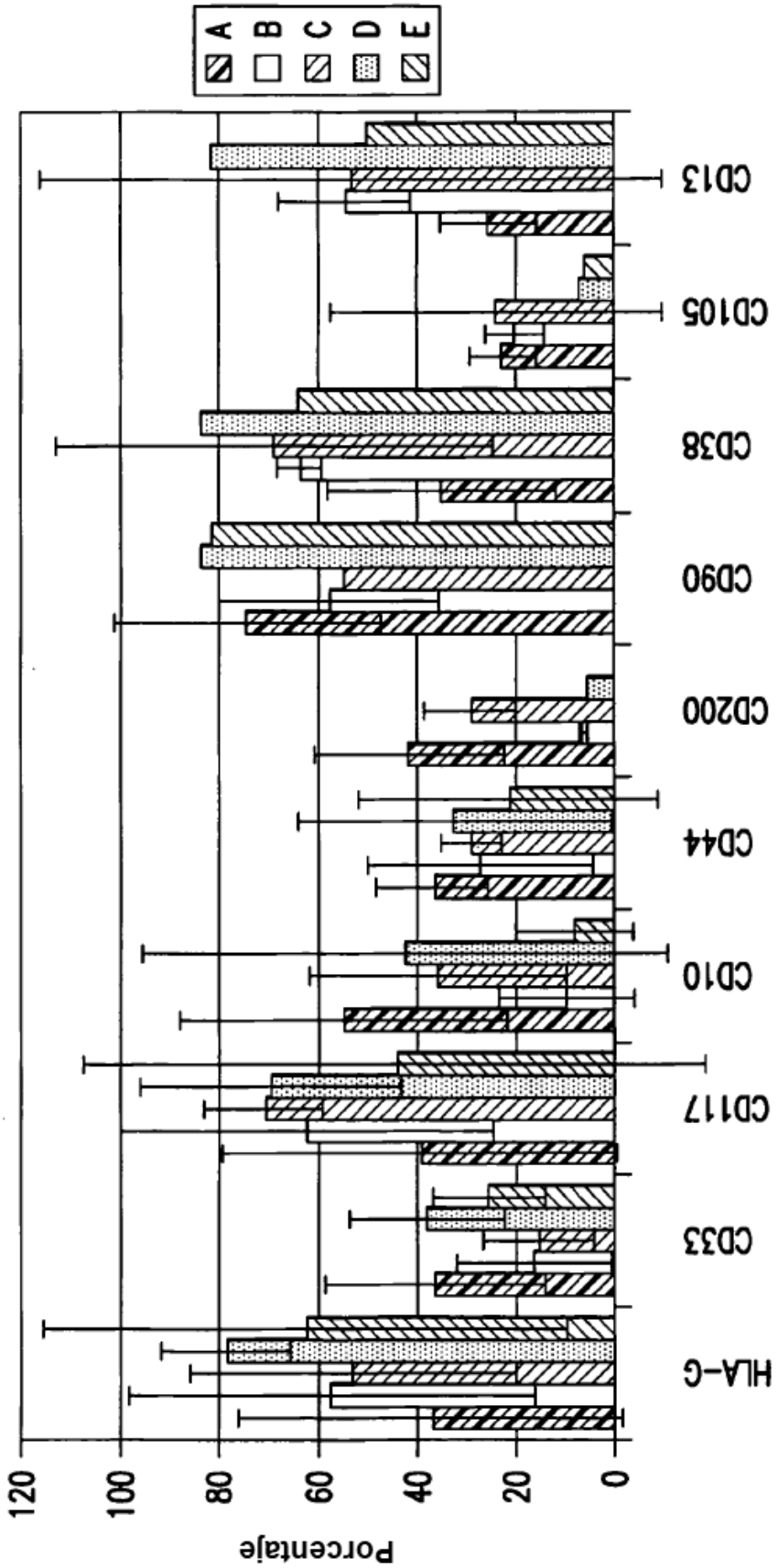

A
B
C
D
E
Porcentaje
120
100
80
60
40
20
0
HLA-G
CD33
CD117
CD10
CD44
CD200
CD90
CD38
CD105
CD13

FIG.9

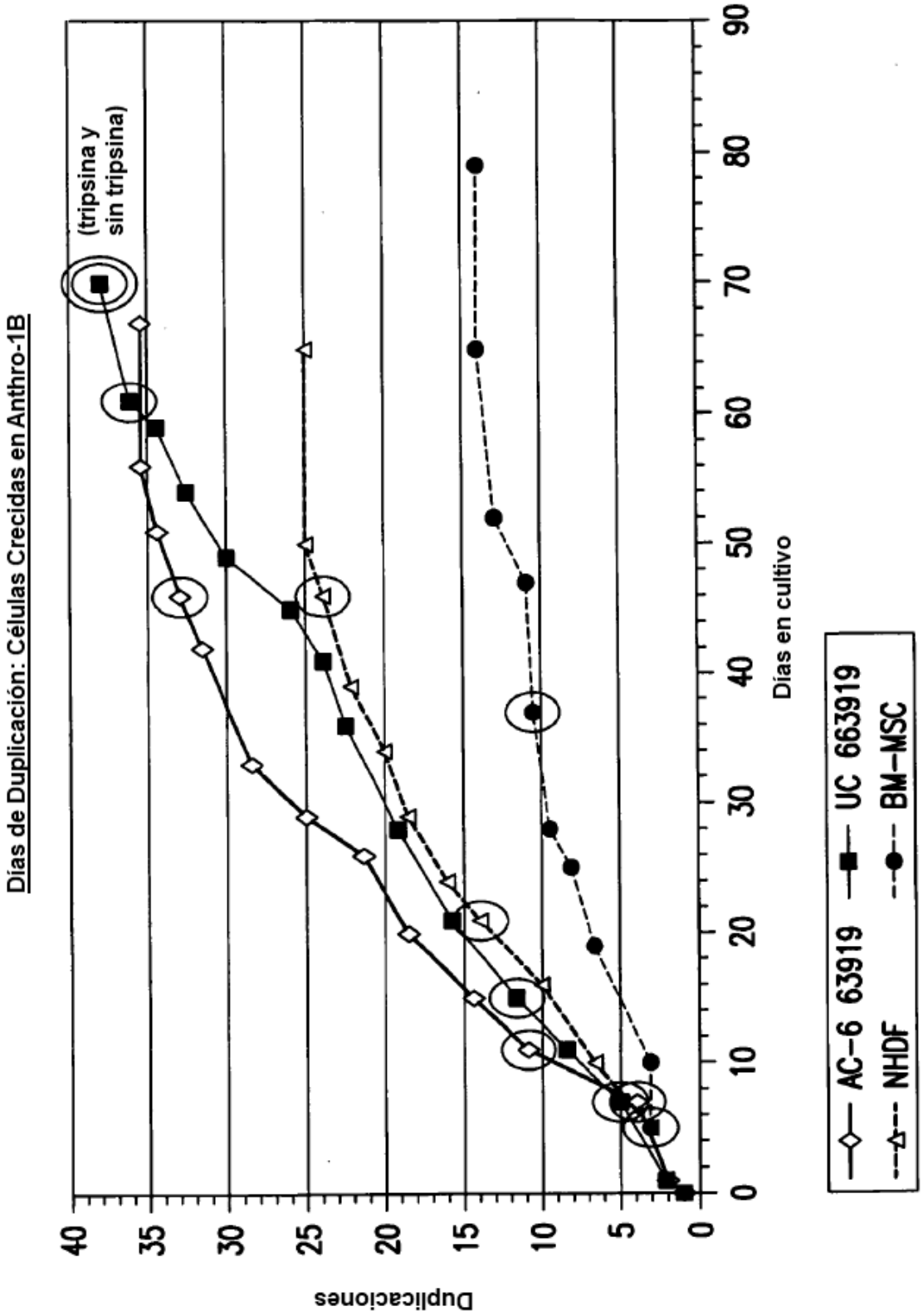

Días de Duplicación: Células Crecidas en Anthro-1B
(tripsina y sin tripsina)
Duplicaciones
Días en cultivo
0
5
10
15
20
25
30
35
40
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
AC-6 63919
UC 663919
NHDF
BM-MSC

FIG.10

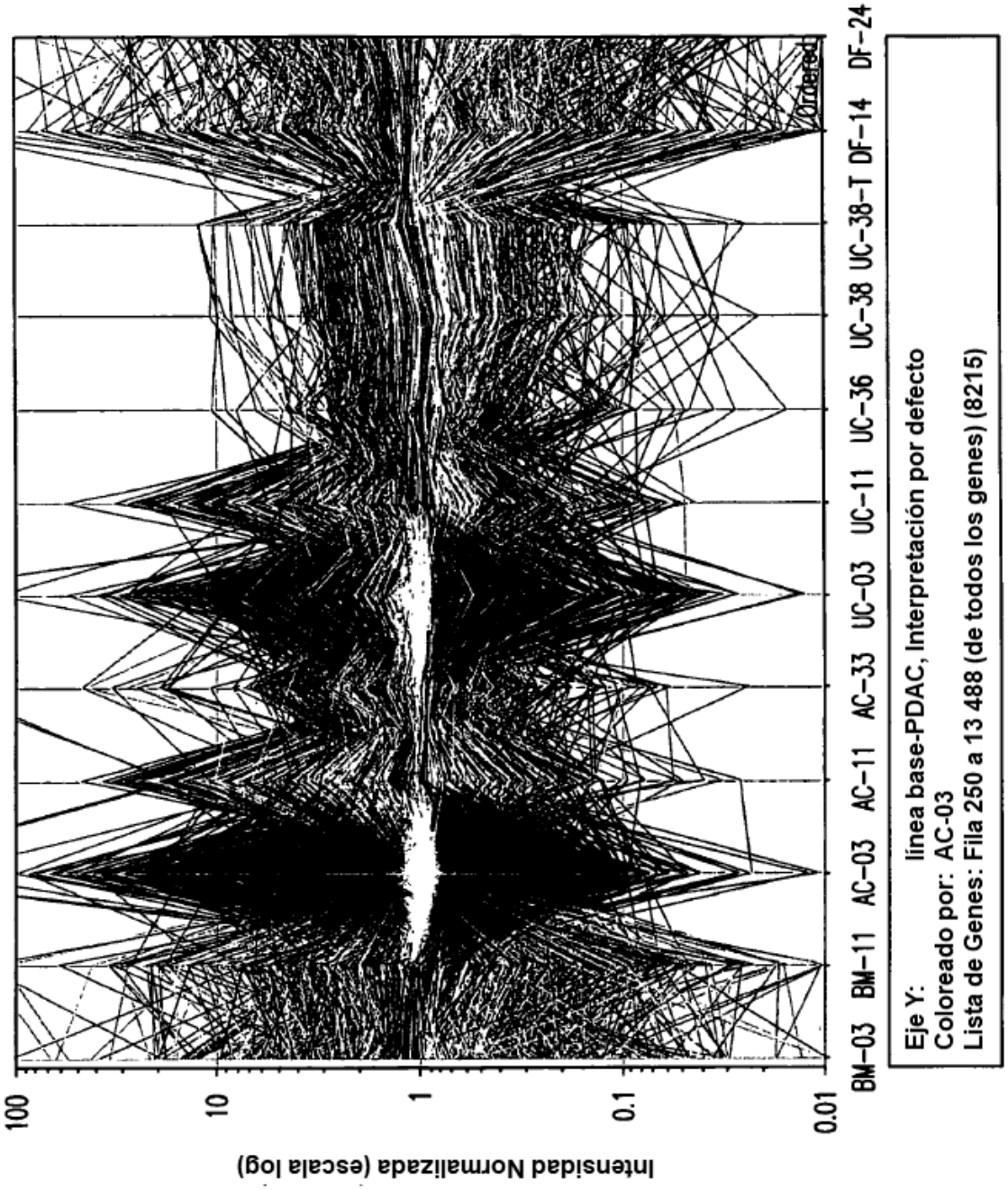

Intensidad Normalizada (escala log)
100
10
1
0.1
0.01
BM-03 BM-11 AC-03 AC-11 AC-33 UC-03 UC-11 UC-36 UC-38 UC-38-T DF-14 DF-24
Ordered
Eje Y: línea base-PDAC, Interpretación por defecto
Coloreado por: AC-03
Lista de Genes: Fila 250 a 13 488 (de todos los genes) (8215)

FIG.11

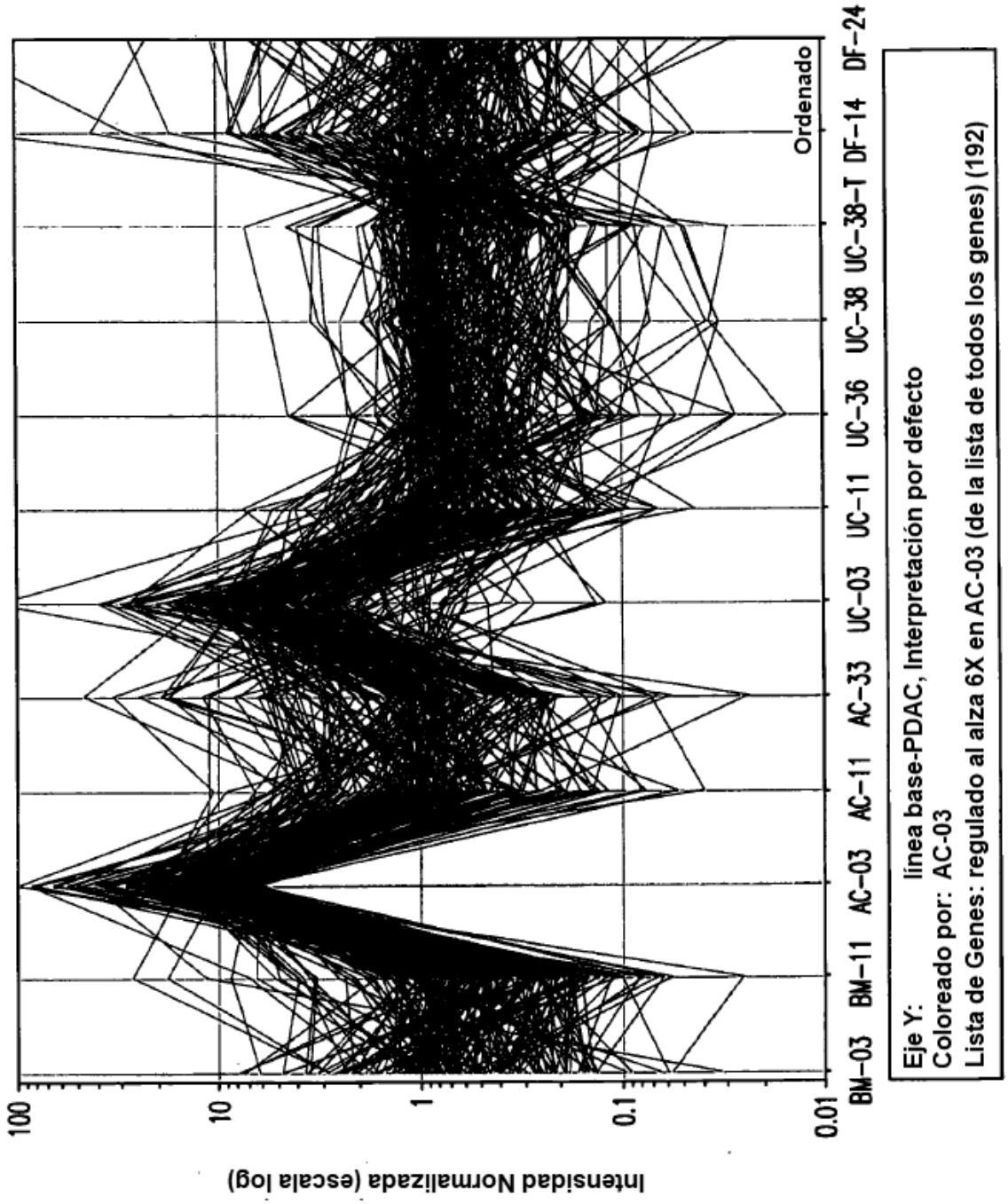

Intensidad Normalizada (escala log)
100
10
1
0.1
0.01
BM-03
BM-11
AC-03
AC-11
AC-33
UC-03
UC-11
UC-36
UC-38
UC-38-T
DF-14
DF-24
Ordenado
Eje Y: línea base-PDAC, Interpretación por defecto
Coloreado por: AC-03
Lista de Genes: regulado al alza 6X en AC-03 (de la lista de todos los genes) (192)

FIG. 12

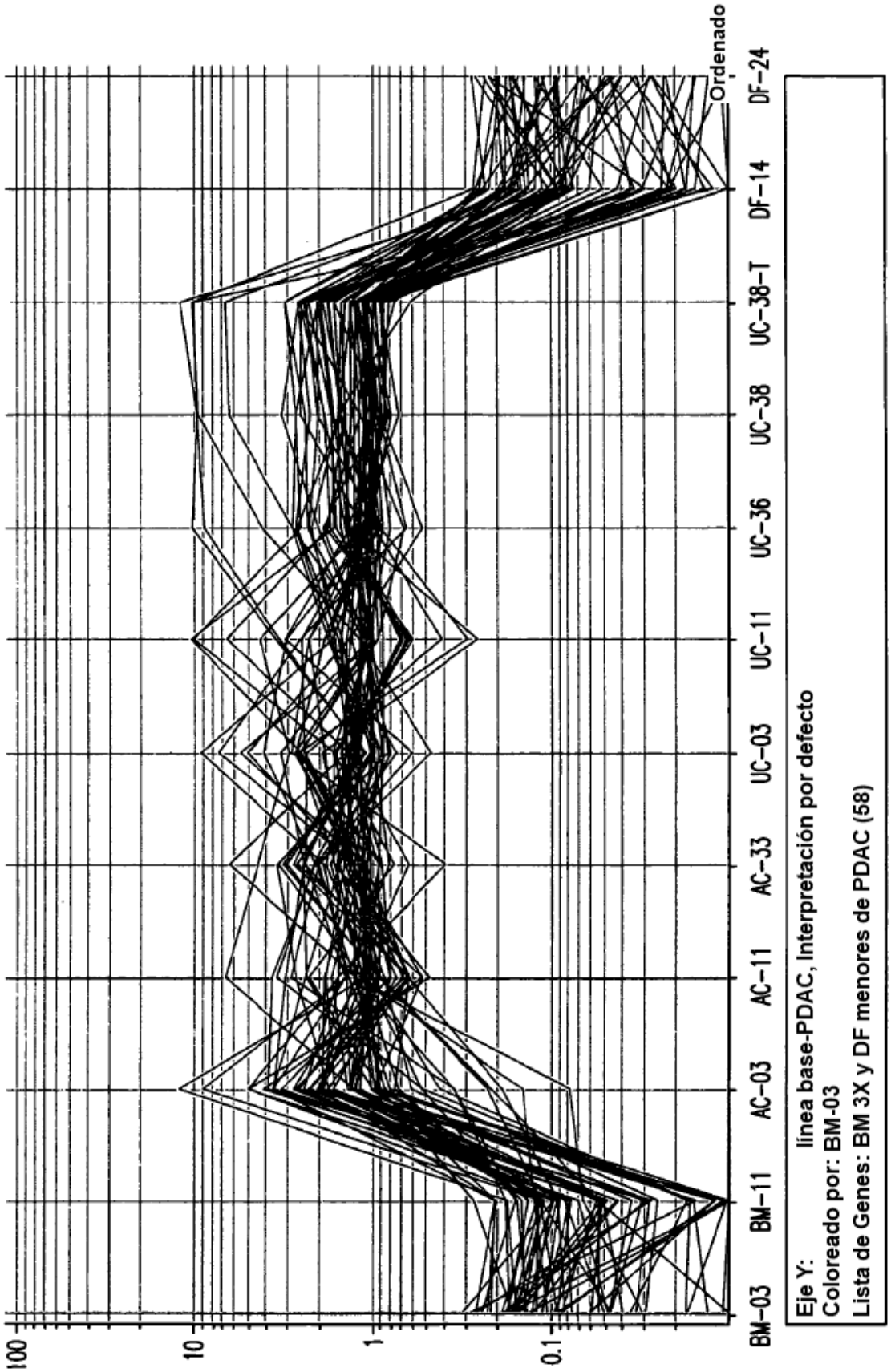

100
10
1
0.1
BM-03
BM-11
AC-03
AC-11
AC-33
UC-03
UC-11
UC-36
UC-38
UC-38-T
DF-14
DF-24
Ordenado
Eje Y: línea base-PDAC, Interpretación por defecto
Coloreado por: BM-03
Lista de Genes: BM 3X y DF menores de PDAC (58)

FIG.13

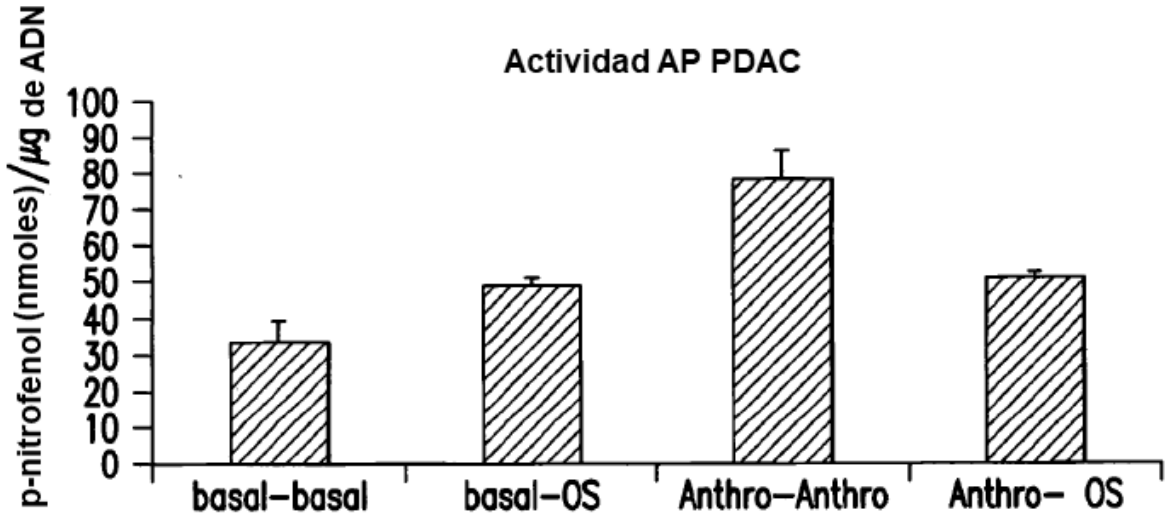


FIG.14A

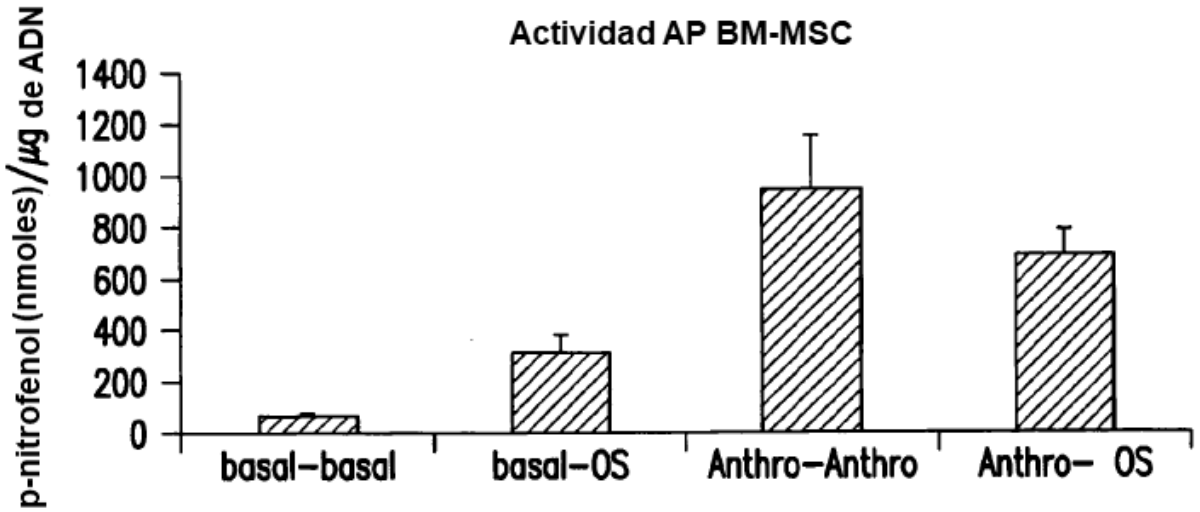


FIG.14B

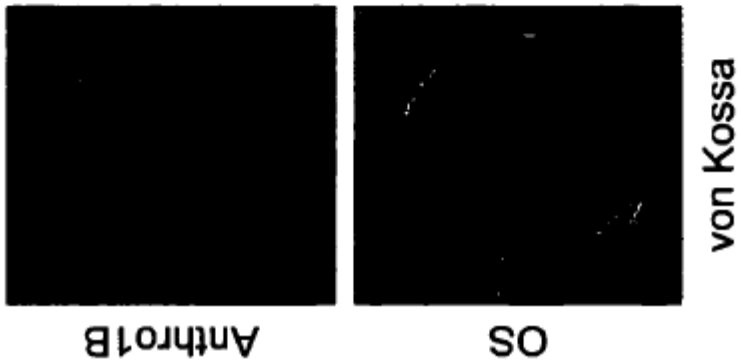


FIG.15A

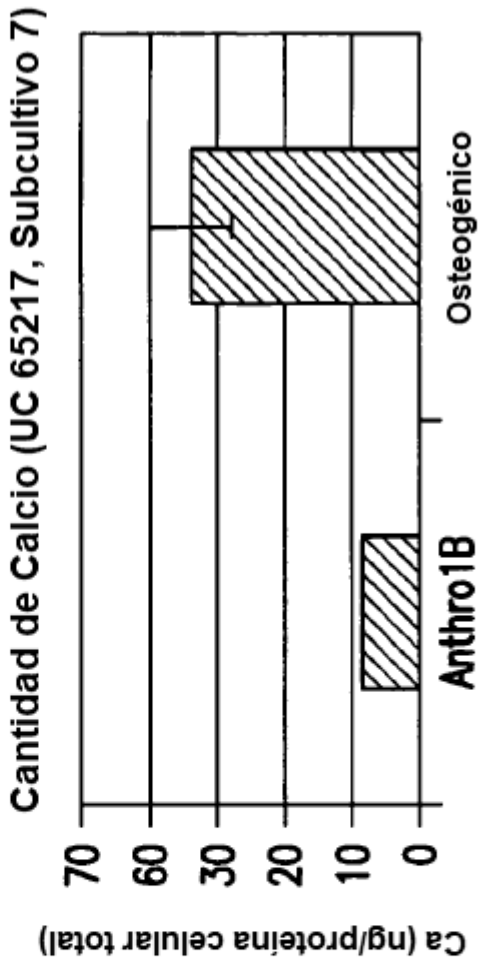


FIG.15B

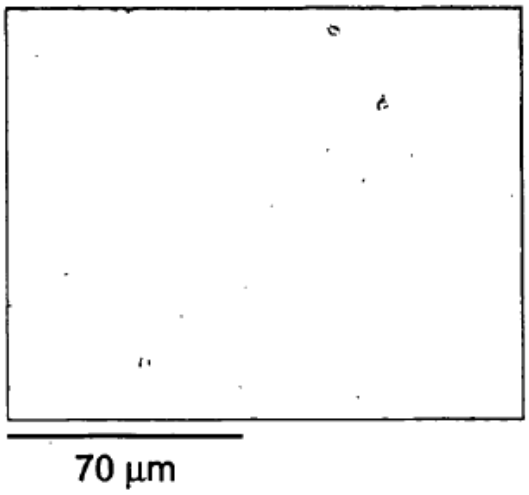


FIG.16A

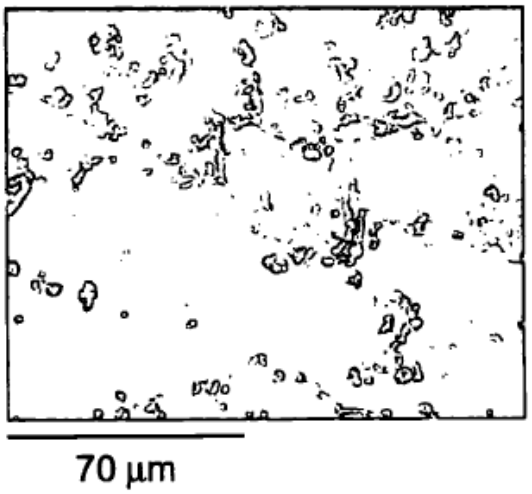


FIG.16B

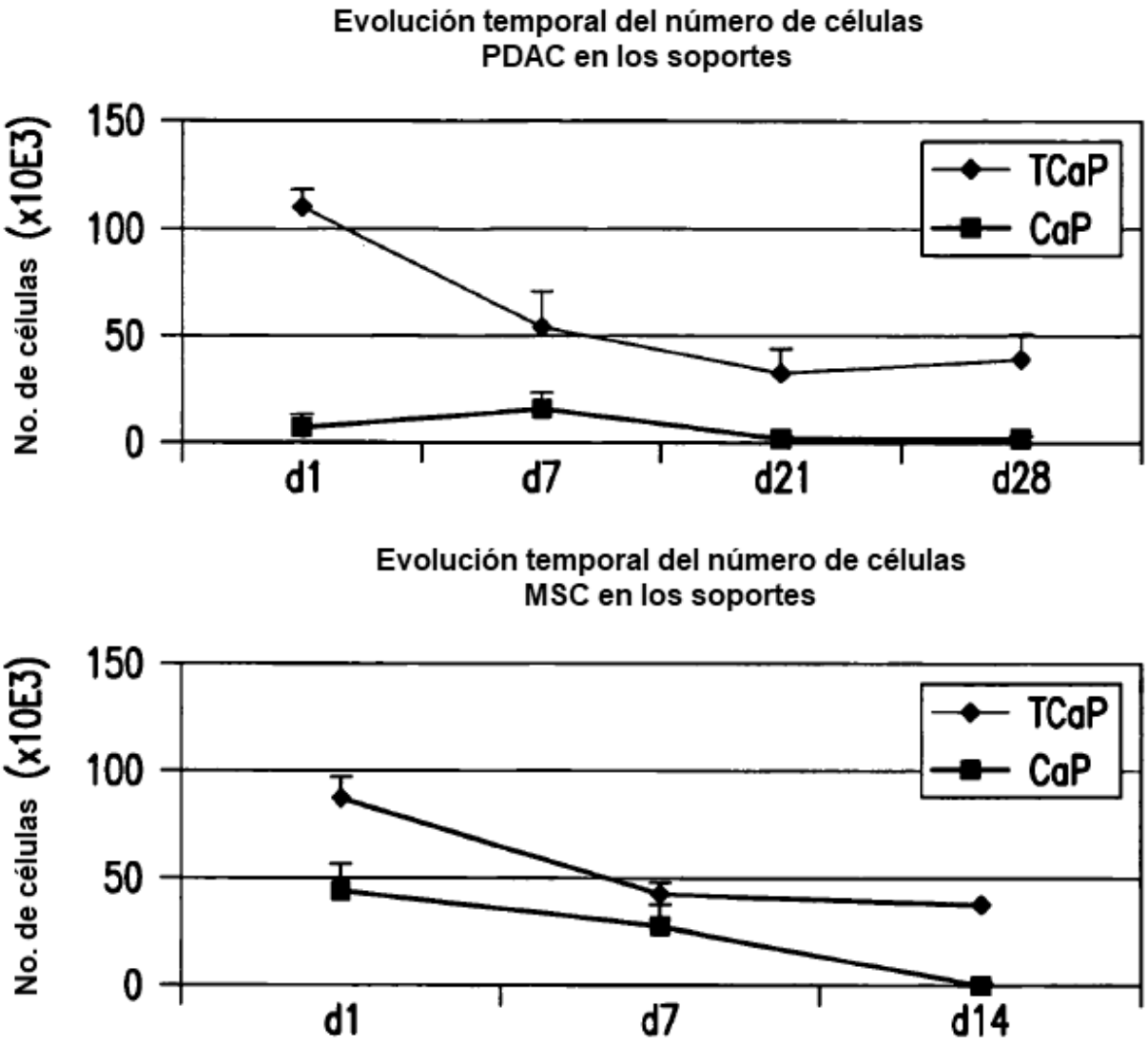

Evolución temporal del número de células
PDAC en los soportes
No. de células (x10E3)
150
100
50
0
d1
d7
d21
d28
TCaP
CaP
Evolución temporal del número de células
MSC en los soportes
No. de células (x10E3)
150
100
50
0
d1
d7
d14
TCaP
CaP

FIG. 17

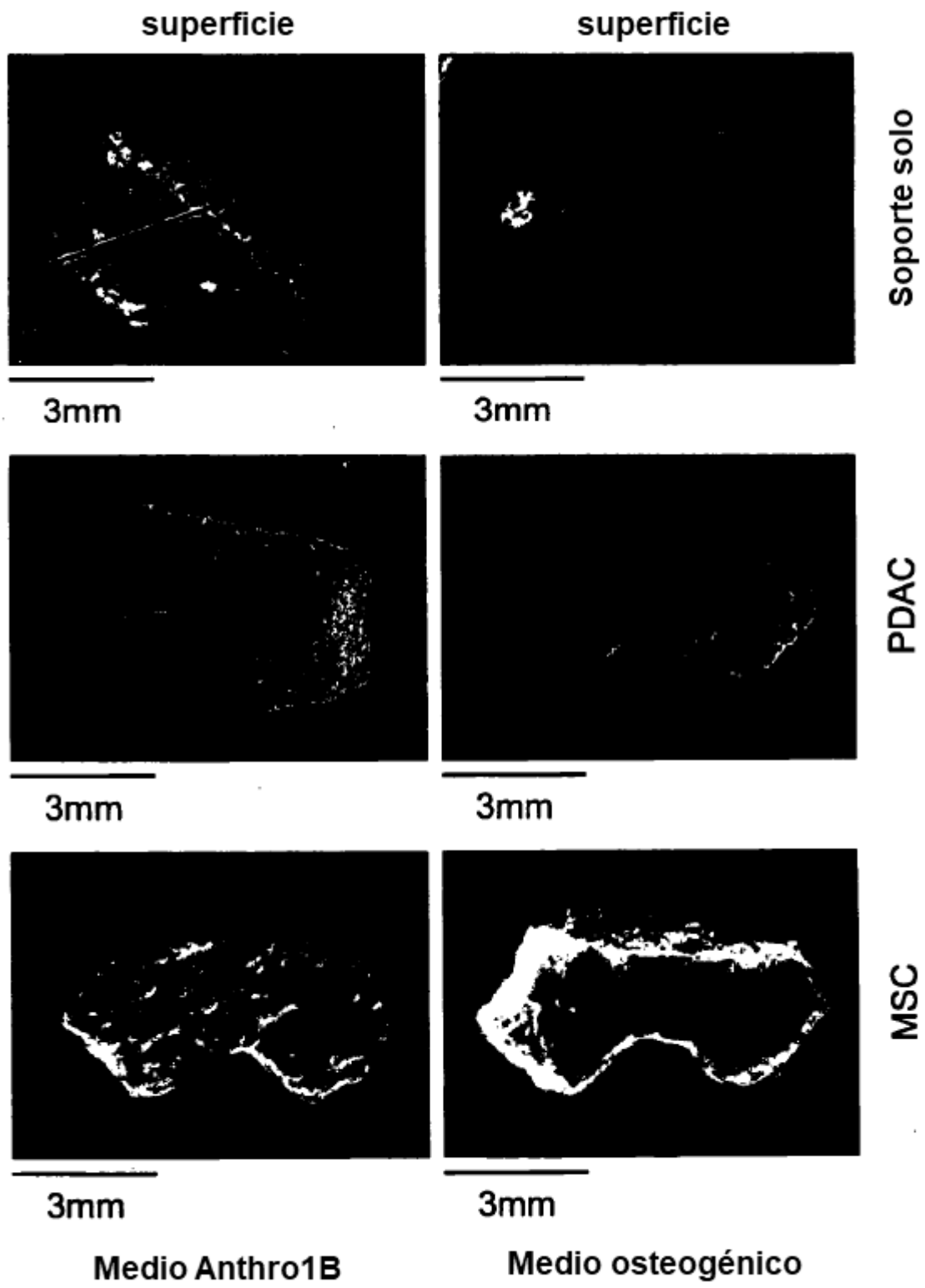

superficie
superficie
Soporte solo
3mm
3mm
PDAC
3mm
3mm
MSC
3mm
3mm
Medio Anthro1B
Medio osteogénico

FIG.18

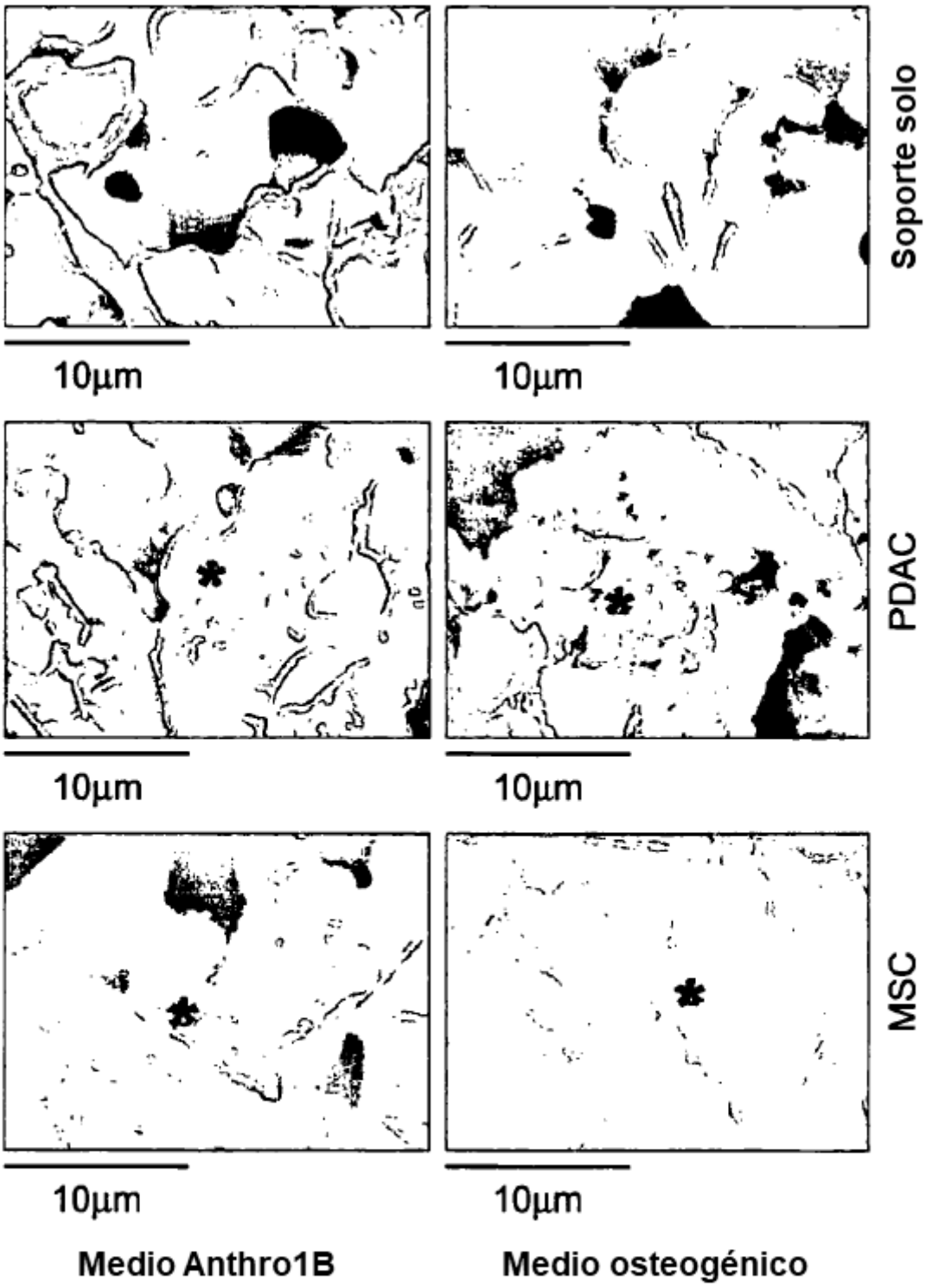
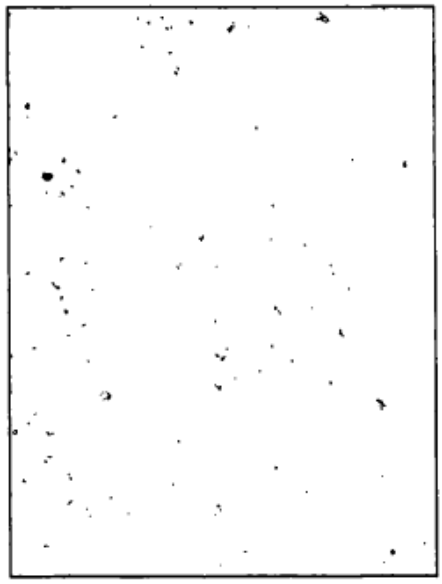
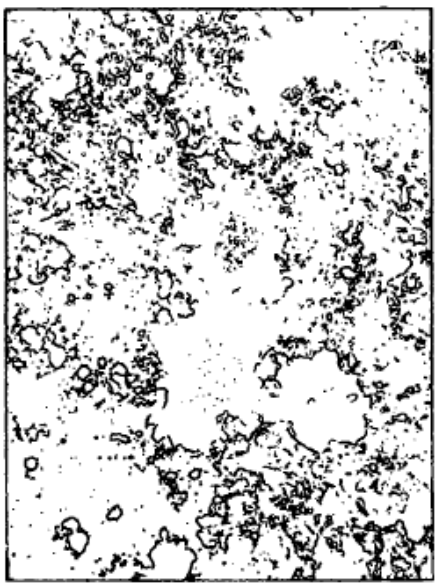

Soporte solo
PDAC
MSC
10µm
10µm
10µm
10µm
10µm
10µm
Medio Anthro1B
Medio osteogénico

FIG.19



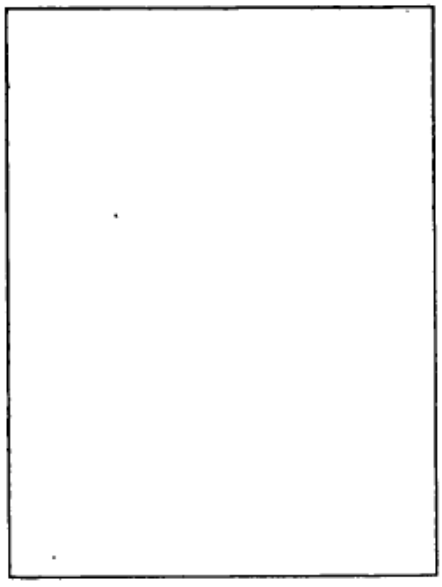
hMSCs

FIG.20A



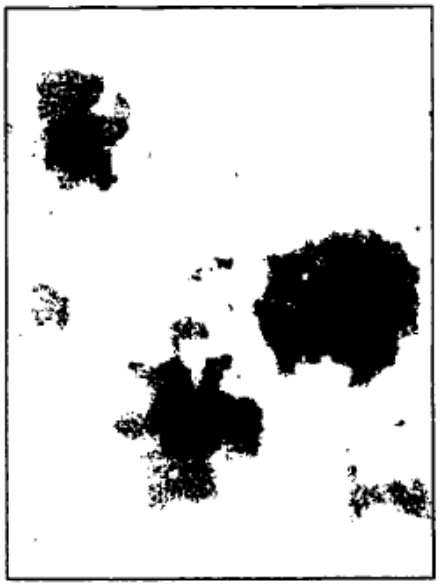
hMSCs

FIG.20B



HPPs

FIG.20C



HPPs

FIG.20D

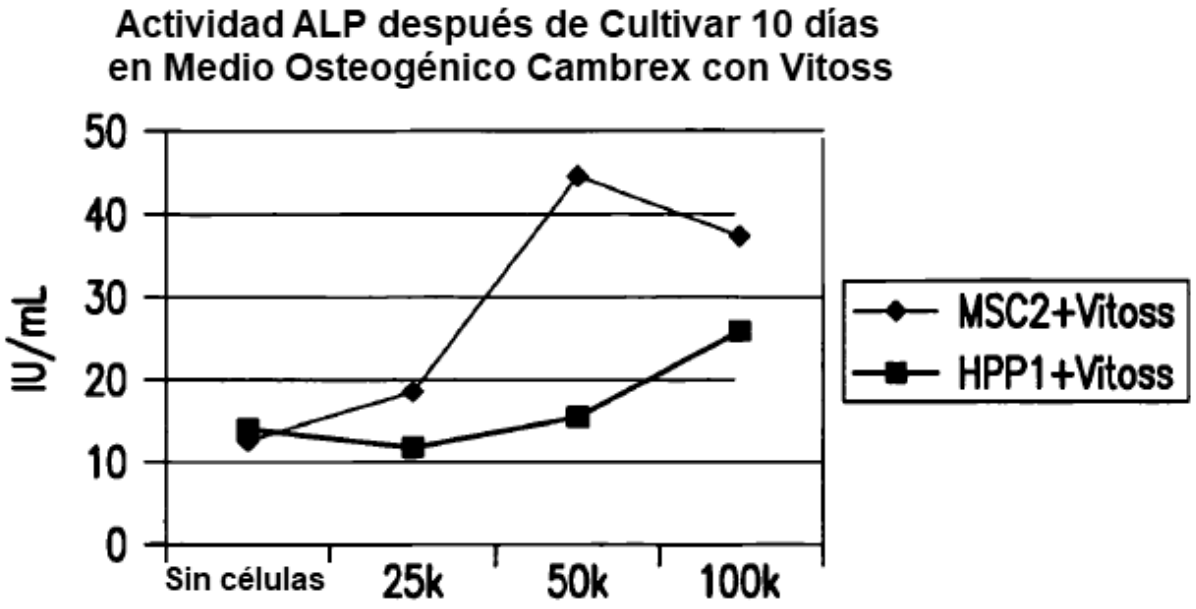

Actividad ALP después de Cultivar 10 días
en Medio Osteogénico Cambrex con Vitoss
IU/mL
50
40
30
20
10
0
Sin células
25k
50k
100k
MSC2+Vitoss
HPP1+Vitoss

FIG.21

CS061506-1(collagen)_0hrs_20x_phase001.jpg

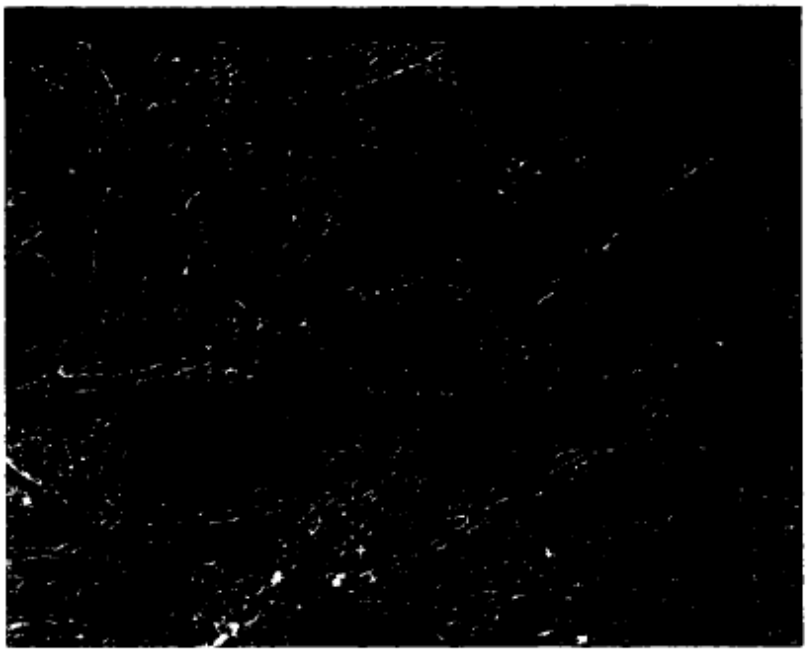


FIG.22A

CS062608-1_2-5hrs_20x_phase002.jpg

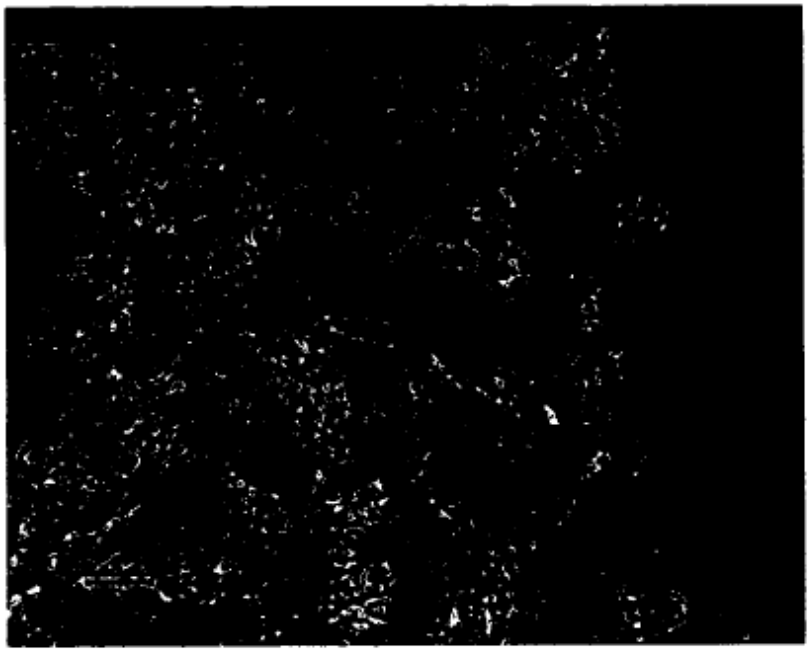


FIG.22B

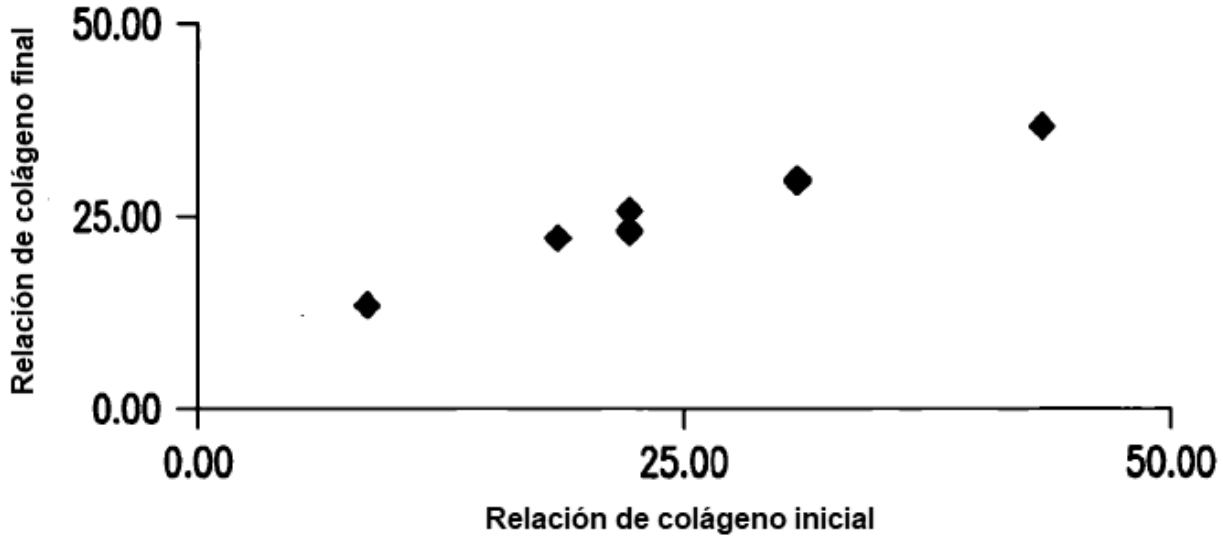

50.00
25.00
0.00
Relación de colágeno final
0.00
25.00
50.00
Relación de colágeno inicial

FIG.23

FIG.24

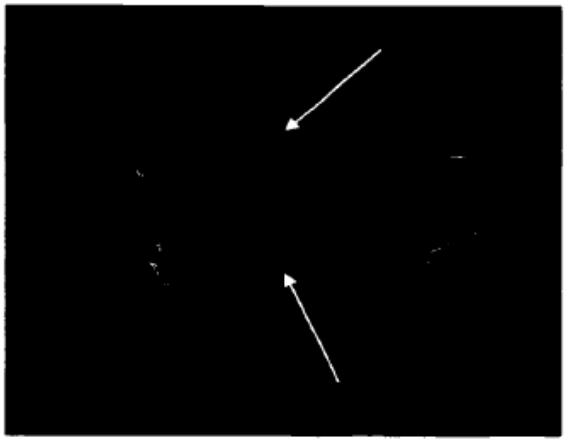


FIG.25A

FIG.25B

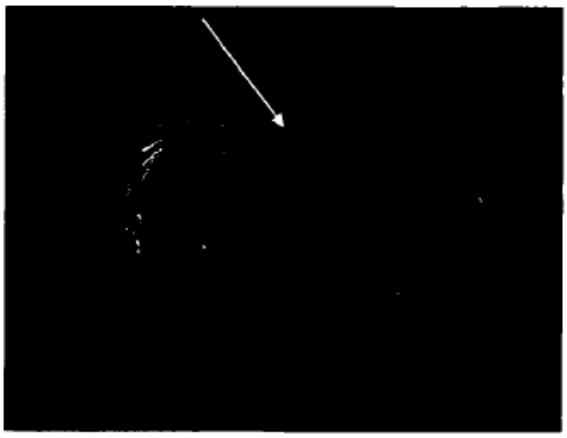


FIG.25C

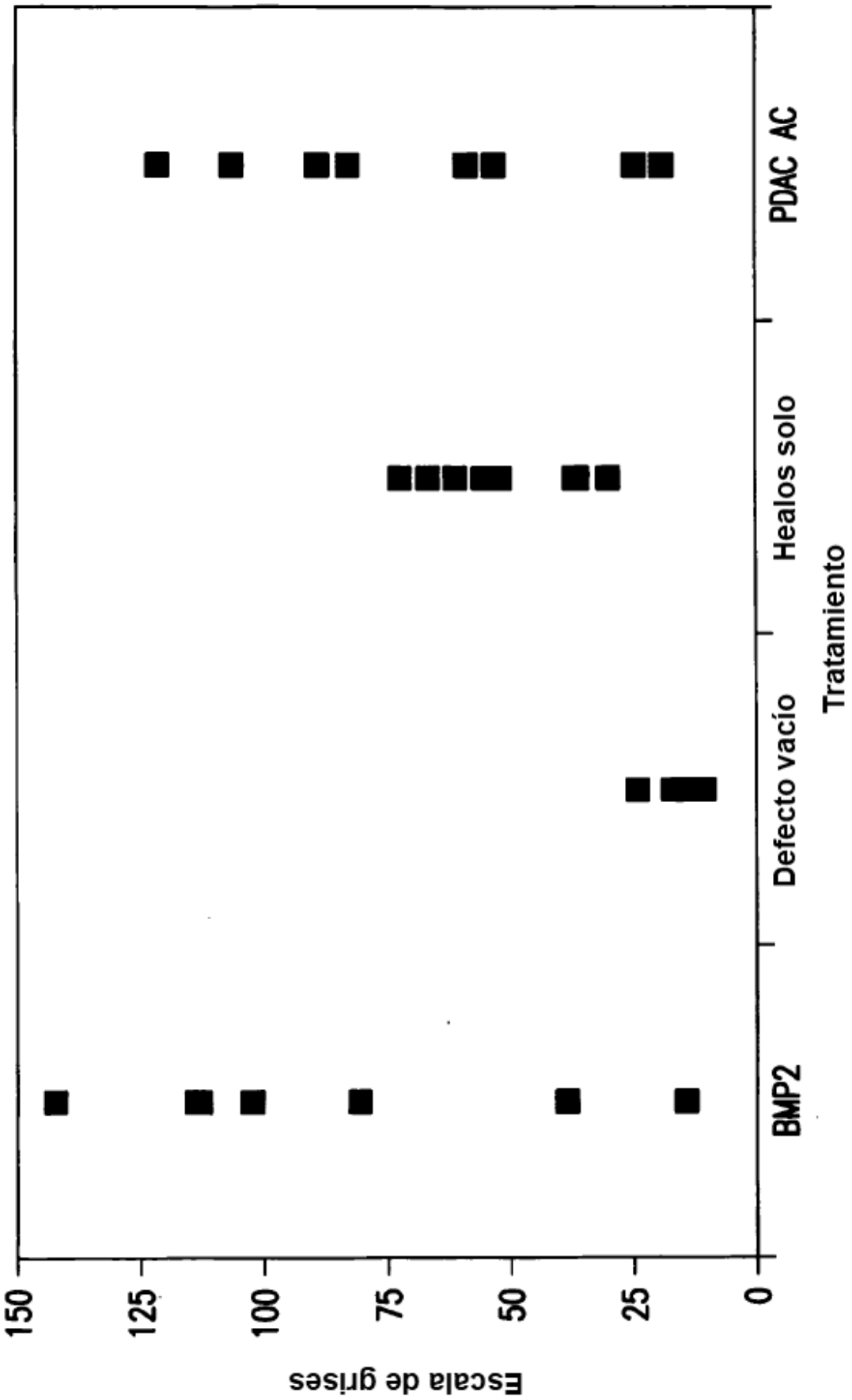

Escala de grises
150
125
100
75
50
25
0
BMP2
Defecto vacío
Healos solo
PDAC AC
Tratamiento

FIG.26