

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 340**

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2009 PCT/US2009/065509**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2010 WO10060031**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2009 E 09828342 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2375907**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones pulmonares utilizando células placentarias**

30 Prioridad:

21.11.2008 US 117004 P

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

15.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HARIRI, ROBERT J.;
FALECK, HERBERT y
ZEITLIN, ANDREW**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 731 340 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones pulmonares utilizando células placentarias

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. No. 61/117.004, presentada el 21 de noviembre de 2008.

5 **1. Campo**

En la presente invención se proporcionan células placentarias para usar en métodos de tratamiento de individuos que tienen una enfermedad, trastorno o afección pulmonar. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección está causada por, o se relaciona con, una respuesta inmune no deseada o perjudicial.

2. Antecedentes

10 La enfermedad pulmonar es la tercera causa de muerte en Estados Unidos, responsable de una de cada seis muertes. La enfermedad pulmonar y otros problemas respiratorios constituyen una de las principales causas de muerte en bebés menores de un año. En la actualidad, más de 35 millones de estadounidenses viven con una enfermedad pulmonar crónica tal como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) también conocida como enfisema y bronquitis crónica. (Sitio web de la American Lung Association, www.lungusa.org/site/c.dvLUK9O0E/b.33316/, descargado el 21 de noviembre de 2008). No hay suficientes tratamientos adecuados para las enfermedades pulmonares, y se necesitan urgentemente nuevas terapias.

3. Compendio

20 La presente invención proporciona células madre placentarias para usar en un método para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección pulmonar, en donde el método comprende la administración de la célula madre placentaria a un individuo en una cantidad terapéuticamente eficaz, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una mejoría detectable en uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o afección, en donde las células madre placentarias son CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, y CD105⁺, detectables por citometría de flujo, y en donde el método comprende detectar dicha mejoría mediante uno o más de medidor de flujo máximo, detección de niveles de CO₂ en sangre, radiografía, tomografía computarizada, imágenes por resonancia magnética, broncoscopia, o lavado bronqueolar.

25 En ciertas realizaciones de las células madre placentarias para usar en la invención, dicha enfermedad, trastorno o afección está (a) asociada con, o causada por, una respuesta inmune; (b) es una enfermedad pulmonar intersticial; (c) una enfermedad pulmonar obstructiva; (d) una lesión pulmonar aguda; o (e) una lesión pulmonar causada por una enfermedad neoplásica o paraneoplásica, neumonía, o fibrosis quística.

30 En cierta realización, dicha enfermedad, trastorno o afección, asociada con, o causada por una respuesta inmune es una enfermedad autoinmune, o una enfermedad de injerto contra el huésped. En otra realización más, dicha enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, esclerodermia, enfermedad inflamatoria intestinal, o lupus eritematoso sistémico. En otra realización, dicha enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar intersticial. En otra realización, dicha enfermedad pulmonar obstructiva es asma, bronquitis, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En otra realización, dicha lesión pulmonar aguda está causada por una quemadura química, inhalación de humo o exposición a una sustancia tóxica. En otra realización, dicha enfermedad, trastorno o afección es una lesión pulmonar causada por enfermedad neoplásica o paraneoplásica, neumonía, o fibrosis quística, y en donde dicha administración da como resultado una relación de volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁) a capacidad vital forzada (FVC) superior a 0,7.

40 En cierta realización, dichas células madre placentarias son CD90⁺ y CD45⁻, detectables por citometría de flujo. Preferiblemente, dichas células madre placentarias son CD44⁺, detectables por citometría de flujo. Preferiblemente, dichas células madre placentarias son CD80⁻ y CD86⁻, detectables por citometría de flujo. En otra realización, dichas células madre placentarias son una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺, detectables por citometría de flujo. En otra realización más, dichas células madre placentarias son al menos una de CD200⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻, CD80⁻, CD86⁻, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁻, o PDL⁺.

45 Dentro de los límites de la presente invención, la referencia a células madre placentarias para usar en la invención de la siguiente descripción significará células madre placentarias que son CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, y CD105⁺, para usar en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección pulmonar como se ha definido anteriormente. Las células pueden ser opcionalmente positivas o negativas para marcadores celulares adicionales.

50 En la presente invención se proporcionan células madre placentarias o células de cordón umbilical para usar en métodos y composiciones para tratar, controlar, o mejorar enfermedades, trastornos y/o afecciones pulmonares que comprenden administrar células placentarias o células de cordón umbilical a un individuo que lo necesite. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección está asociada con, o causada por, una respuesta inmune, por ejemplo, asociada con, dando como resultado o causada por inflamación. Las células placentarias o células de

cordón umbilical son células multipotentes no trofoblásticas adherentes al plástico de cultivo tisular denominadas en la presente memoria células madre placentarias, que se describen con detalle en la Sección 4.2, más adelante.

En una realización, en la presente invención se proporcionan células madre placentarias para usar en un método para tratar a un individuo que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección pulmonar, que comprende administrar al individuo células madre placentarias, o medio condicionado por células madre placentarias, de modo que se produzca una mejoría detectable en uno o más síntomas o una reducción en la progresión de uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o afección. En una realización específica, dicha enfermedad, trastorno o afección está causada por una respuesta inmune, por ejemplo inflamación. En otra realización específica, dicha enfermedad, trastorno o afección resulta de una causa además de una respuesta inmune, por ejemplo inflamación. En una realización específica, dicha enfermedad, trastorno o afección se debe a una causa distinta de una respuesta inmune, por ejemplo inflamación.

En una realización específica, dicha enfermedad, trastorno o afección pulmonar es una lesión pulmonar aguda. En realizaciones más específicas, dicha lesión pulmonar aguda es uno o más de trauma físico, una lesión química, por ejemplo una quemadura química, inhalación de humo, o exposición a una sustancia tóxica. En otra realización específica, dicha enfermedad, trastorno o afección pulmonar es una lesión causada por una enfermedad neoplásica o paraneoplásica.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección es una o más de una enfermedad fibrótica pulmonar, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ARDS), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfisema, asma, una infección viral o bacteriana del pulmón, neumonía (incluida la neumonía inducida químicamente), o fibrosis quística. En una realización específica, la enfermedad fibrótica del pulmón es una enfermedad pulmonar intersticial (enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa). En realizaciones más específicas, la enfermedad pulmonar intersticial es silicosis, asbestosis, beriliosis, esclerosis sistémica, polimiositis, o dermatomiositis. En otras realizaciones más específicas, la enfermedad pulmonar intersticial está causada por un antibiótico, un fármaco quimioterapéutico, un fármaco antiarrítmico, o una infección.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección pulmonar está asociada con, o causada por, una respuesta inmune perjudicial, deletérea, inapropiada o no deseada, por ejemplo, inflamación, en donde dicha enfermedad, trastorno o afección afecta o manifiesta síntomas en los pulmones. En realizaciones específicas, dicha enfermedad, trastorno o afección es una o más de lupus, por ejemplo lupus eritematoso, esclerodermia, o una enfermedad reumatológica (por ejemplo, artritis reumatoide).

En otra realización específica, dicha enfermedad, trastorno o afección es enfermedad pulmonar reumatoide (RLD), por ejemplo enfermedad pulmonar reumatoide asociada con artritis reumatoide. En otra realización específica, la administración es suficiente para causar una mejoría detectable en uno o más síntomas de la RLD, o suficiente para reducir o ralentizar de modo detectable la progresión de uno o más síntomas de la RLD, por ejemplo en un pulmón del individuo. En una realización más específica, dicho síntoma de la RLD es una afección adjunta a la RLD. En una realización más específica, dicha afección adjunta a la RLD es una infección, por ejemplo una infección viral de los pulmones, o fibrosis de los pulmones (por ejemplo, como consecuencia de la terapia con metotrexato).

En otra realización específica del método de tratamiento, las células placentarias, por ejemplo, células madre placentarias, se han diseñado genéticamente para expresar una proteína de fusión que comprende IL-1Ra y DHFR.

En otra realización específica, la enfermedad, trastorno o afección es lupus eritematoso, por ejemplo lupus eritematoso sistémico (SLE). En una realización más específica, dicho síntoma de lupus eritematoso es uno o más de inflamación pulmonar y/o pleural, pleuresía, pleuritis, derrame pleural, neumonitis por lupus, o enfermedad pulmonar intersticial difusa crónica.

En otra realización específica de cualquiera de los métodos anteriores, el método comprende la administración de un segundo agente terapéutico al individuo que tiene la enfermedad, trastorno o afección. En una realización más específica, dicho segundo agente terapéutico es un agente antiinflamatorio, un agente inmunomodulador, y un agente inmunosupresor, una medicación para el dolor, o un antibiótico. En una realización más específica, el segundo agente terapéutico es un agente inmunomodulador. En otra realización más específica, el segundo agente es un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT3, muronomab), anticuerpo anti-receptor de IL-2 (por ejemplo, basiliximab (SIMULECT®) y daclizumab (ZENAPAX®)), un anticuerpo anti-receptor de células T (por ejemplo, Muromonab-CD3), azatioprina, un inhibidor de calcineurina, un corticosteroide, ciclosporina, metotrexato, mercaptopurina, micofenolato mofetilo, tacrolimus, o sirolimus. En otra realización más específica, el segundo agente terapéutico comprende una célula madre de otro tipo, por ejemplo una célula madre mesenquimal derivada de la médula ósea, médula ósea, o una célula madre hematopoyética.

En ciertas realizaciones, las células placentarias son células madre placentarias que son fibroblastoides, adherentes al plástico de cultivo tisular, tienen la capacidad de diferenciarse en células que muestran una o más características de una célula osteogénica, una célula condrogénica o una célula neurogénica, pueden replicarse entre aproximadamente 10-40 veces en cultivo, y/o mostrar marcadores celulares característicos, como se describe en la presente memoria.

En una realización específica, las células madre placentarias son CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, y CD200⁺. En otra realización más, las células placentarias son CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, y al menos una de: CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻, CD80⁻, CD86⁻, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁻, o PDL⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias expresan adicionalmente HLA-G, o expresan CD73, o expresan OCT-4 (también conocido como Octamer-4; proteína 4 de unión a octamer; POU5F1), o expresan CD73, y HLA-G, o expresan CD73 y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprenden dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embriode, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprenden dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embriode. En una realización más específica, las células placentarias suprimen la actividad de una célula inmune, por ejemplo suprimen la proliferación de células T, por ejemplo células T CD4⁺ o células T CD8⁺.

Se pueden administrar células madre placentarias, o medio condicionado por células madre placentarias, en una sola dosis o en múltiples dosis. Cuando se administran en múltiples dosis, las dosis pueden ser parte de un régimen terapéutico diseñado para aliviar uno o más síntomas agudos de la enfermedad, trastorno o afección, en donde la enfermedad, trastorno o afección está causada por, o está asociada con, una respuesta inmune inapropiada o no deseada, o puede ser parte de un régimen terapéutico a largo plazo diseñado para prevenir, o disminuir la gravedad, de un curso crónico de dicha enfermedad, trastorno o afección. Cuando se administra un segundo agente terapéutico, la administración de los dos agentes puede ser simultánea o secuencial.

3.1 Definiciones

Como se usa en la presente memoria, el término "SH2" se refiere a un anticuerpo que se une a un epítipo en el marcador CD105. Por tanto, las células que se denominan SH2⁺ son CD105⁺.

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. Por tanto, las células que se denominan SH3⁺ y/o SH4⁺ son CD73⁺.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "célula aislada", por ejemplo una célula madre aislada, significa una célula que está sustancialmente separada de otras células del tejido, por ejemplo la placenta o cordón umbilical, del que la célula, por ejemplo célula madre, proviene. Una célula está "aislada" si al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o al menos 99% de las células con las que la célula está asociada de forma natural se separan de la célula, por ejemplo durante la recogida y/o cultivo de la célula.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "población aislada de células" significa una población de células que está sustancialmente separada de otras células del tejido, por ejemplo la placenta, de la que se deriva la población de células. Una población de, por ejemplo, células madre está "aislada" si al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o al menos 99% de las células con las que la población de células madre está asociada de forma natural se separan de la población de células madre, por ejemplo durante la recogida y/o cultivo de la población de células madre.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "célula madre placentaria" se refiere a una célula madre o célula progenitora que se deriva de una placenta o cordón umbilical de mamífero, independientemente de la morfología, marcadores de superficie celular, o el número de pasos tras un cultivo primario, que se adhiere a un sustrato de cultivo tisular (por ejemplo, plástico de cultivo tisular o una placa de cultivo tisular revestida con fibronectina). El término "derivada", en este contexto, incluye aislados primarios de células madre placentarias o células madre placentarias que se han expandido en cultivo. Sin embargo, la expresión "célula madre placentaria", como se usa en la presente memoria, no se refiere a un trofoblasto, a un citotrofoblasto, a una célula germinal embrionaria, o a una célula madre embrionaria, tal como las conocen los expertos en la técnica. En una realización, una célula madre placentaria es una célula multipotente, derivada de una placenta de mamífero, que se adhiere a un sustrato de cultivo tisular, por ejemplo a plástico de cultivo tisular.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "células placentarias" incluye células derivadas de placenta y células derivadas de cordón umbilical.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "célula madre de cordón umbilical" se refiere a una célula madre o célula progenitora que se deriva de un cordón umbilical de mamífero, independientemente de la morfología, marcadores de la superficie celular o el número de pasos tras un cultivo primario, que se adhiere a un sustrato de cultivo tisular (por ejemplo, plástico de cultivo tisular o una placa de cultivo tisular revestida con fibronectina). En una realización, una célula madre de cordón umbilical es una célula multipotente, derivada de un cordón umbilical de mamífero, que se adhiere a un sustrato de tejido tisular, por ejemplo a plástico de cultivo tisular.

Una célula se considera "célula madre" si la célula retiene al menos un atributo de una célula madre, por ejemplo 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; multipotencia, por ejemplo la capacidad para diferenciarse, ya sea *in vitro*, *in vivo* o ambos, en al menos un subconjunto de los tipos de células del cuerpo, por ejemplo de una o más de las tres capas germinales, endodermo, mesodermo, o ectodermo; la falta de características celulares adultas (es decir,

diferenciadas), o similares. Las expresiones “célula madre placentaria” y “célula madre derivada de placenta” se pueden usar indistintamente. Las células madre placentarias descritas en la presente memoria son, en ciertas realizaciones, multipotentes *in vitro* (es decir, las células se diferencian *in vitro* en condiciones de diferenciación), multipotentes *in vivo* (es decir, las células se diferencian *in vivo*), o ambos tipos.

- 5 Como se usa en la presente memoria, una célula, por ejemplo célula madre es “positiva” para un marcador particular cuando ese marcador es detectable. Por ejemplo, una célula madre placentaria es positiva para, por ejemplo, CD73 porque CD73 es detectable en células madre placentarias en una cantidad detectablemente mayor que el fondo (en comparación con, por ejemplo, un control de isotipo). Una célula es también positiva para un marcador cuando ese marcador se puede usar para distinguir la célula de al menos otro tipo de célula, o se puede usar para seleccionar o
10 aislar la célula cuando está presente o expresado por la célula. Los marcadores expresados en la superficie celular pueden, por ejemplo, detectarse utilizando tecnología de clasificación celular tal como la citometría de flujo. También se pueden detectar marcadores, por ejemplo, usando una micromatriz de ácido nucleico o tecnología RT-PCR.

Como se usa en la presente memoria, “inmunomodulación” e “inmunomodulador” significa causar, o tener la capacidad de causar, un cambio detectable en una respuesta inmune.

- 15 Como se usa en la presente memoria, “inmunosupresión” e “inmunosupresor” significa causar, o tener la capacidad de causar, una reducción detectable en una respuesta inmune, y la capacidad de causar una supresión detectable de una respuesta inmune.

4. Descripción detallada

- 20 La presente invención proporciona células madre placentarias para usar en un método para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección pulmonar, en donde el método comprende la administración de la célula madre placentaria a un individuo en una cantidad terapéuticamente eficaz, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una mejoría detectable en uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o afección, en donde las células madre placentarias son CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, y CD105⁺, detectables por citometría de flujo, y en donde el método comprende detectar dicha mejoría mediante uno o más de medidor de flujo máximo,
25 detección de niveles de CO₂ en la sangre, radiografía, tomografía computarizada, imágenes de resonancia magnética, broncoscopia, o lavado bronqueolar.

- En ciertas realizaciones de las células madre placentarias para usar en la invención, dicha enfermedad, trastorno o afección (a) está asociada con, o causada por, una respuesta inmune; (b) es una enfermedad pulmonar intersticial; (c) es una enfermedad pulmonar obstructiva; (d) es una lesión pulmonar aguda; o (e) es una lesión pulmonar
30 causada por una enfermedad neoplásica o paraneoplásica, neumonía, o fibrosis quística.

- En cierta realización, dicha enfermedad, trastorno o afección asociada con, o causada por, una respuesta inmune es una enfermedad autoinmune, o una enfermedad de injerto contra el huésped. En otra realización más, dicha enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, esclerodermia, enfermedad inflamatoria intestinal, o lupus eritematoso sistémico. En otra realización, dicha enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar intersticial.
35 En otra realización, dicha enfermedad pulmonar obstructiva es asma, bronquitis, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En otra realización, dicha lesión pulmonar aguda está causada por una quemadura química, inhalación de humo, o exposición a una sustancia tóxica. En otra realización, dicha enfermedad, trastorno o afección es una lesión pulmonar causada por enfermedad neoplásica o paraneoplásica, neumonía, o fibrosis quística, y en donde dicha administración da como resultado una relación de volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁) a capacidad vital forzada (FVC) superior a 0,7.
40

- En cierta realización, dichas células madre placentarias son CD90⁺ y CD45⁻, detectables por citometría de flujo. Preferiblemente, dichas células madre placentarias son CD44⁺, detectables por citometría de flujo. Preferiblemente, dichas células madre placentarias son CD80⁻ y CD86⁻, detectables por citometría de flujo. En otra realización, dichas células madre placentarias son una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺, detectables por
45 citometría de flujo. En otra realización más, dichas células madre placentarias son al menos una de CD200⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻, CD80⁻, CD86⁻, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁻, o PDL⁺.

- La presente invención proporciona células madre placentarias para usar en métodos para el tratamiento de un individuo que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección de, o que afecta a, los pulmones, que comprende administrar al individuo una o más dosis de células madre placentarias, medio condicionado por células madre placentarias, células de cordón umbilical, por ejemplo células madre de cordón umbilical, y/o medio condicionado por células de cordón umbilical. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección está asociada con, surge de, o se relaciona con una respuesta inmune inapropiada, no deseada, perjudicial o deletérea, por ejemplo una enfermedad autoinmune. Las células madre placentarias para usar en métodos para el tratamiento de tales individuos, y para la administración de tales células madre, solas o en combinación con otras terapias, se discuten con detalle más adelante.
50
55

4.1. Células madre placentarias para usar en métodos de tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones pulmonares

En una realización, se proporcionan en esta invención células madre placentarias para usar en un método para tratar a un individuo que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección del, o que afecta al, pulmón, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, o medio condicionado por células madre placentarias, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz causa una mejoría detectable en uno o más síntomas de, o se produce una reducción de la progresión de uno o más síntomas de, dicha enfermedad, trastorno o afección. También se describe en la presente memoria el uso de ciertas células placentarias, por ejemplo células madre placentarias, en la fabricación de un medicamento para tratar, controlar, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos y/o afecciones pulmonares. Las células útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria se describen adicionalmente en la Sección 4.2, más adelante.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección del, o que afecta al, pulmón es una enfermedad, trastorno o afección del, o que afecta al, pulmón no causada por, o relacionada con, una enfermedad autoinmune. En realizaciones específicas, la enfermedad, trastorno o afección del, o que afecta al, pulmón no está relacionada con, o causada por, la enfermedad de injerto contra el huésped, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal, o artritis reumatoide (por ejemplo, no es una enfermedad pulmonar reumatoide). En algunas otras realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección del, o que afecta al, pulmón no está causada por, o relacionada con, inflamación (por ejemplo, no está causada por inflamación del pulmón, o no está causada por una respuesta inflamatoria en un tejido no pulmonar, etc.).

En una realización específica de cualquiera de las realizaciones de la presente invención, las células madre placentarias son células madre placentarias multipotentes. Las células madre placentarias usadas en los métodos descritos en la presente memoria se pueden derivar u obtener de una sola placenta, o de múltiples placentas. Las células madre placentarias también se pueden derivar de una sola especie, por ejemplo la especie del receptor deseado, o se pueden derivar de múltiples especies. "Derivada", como se usa en la presente memoria, significa aislada de placenta o cordón umbilical, o expandida a partir de células aisladas de placenta o cordón umbilical.

4.1.1 Tratamiento de enfermedades o trastornos pulmonares intersticiales

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección de pulmón tratable usando células madre placentarias, es una enfermedad pulmonar intersticial (también conocida como enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa). Por tanto, en la presente invención se proporcionan células madre placentarias para usar en un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad pulmonar intersticial, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias a dicho individuo, por ejemplo al pulmón afectado de dicho individuo. En una realización específica, el método de tratamiento comprende evaluar a dicho individuo para mejorar en uno o más parámetros de la función pulmonar después de dicha administración (por ejemplo, de 7 días a 30 días después), en donde dichos parámetros de la función pulmonar son el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV₁); capacidad vital de volumen forzado (FVC); FEV₁/FVC; flujo espiratorio máximo (PEF); flujo espiratorio forzado de 25%-50% ó 25%-75% (flujo medio de aire que sale del pulmón durante la parte central de la espiración); tiempo espiratorio forzado (FET); capacidad pulmonar total (TLC); capacidad de difusión, monóxido de carbono (DLCO); o ventilación voluntaria máxima. En una realización más específica, dicha administración da como resultado la mejoría de uno o más de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 50%. En una realización más específica, el método comprende identificar cualquiera de dichos parámetros que, antes de la administración son inferiores al 80% de los valores esperados para un individuo de la misma altura y peso, y valorar dichos parámetros después de dicha administración, en donde dicha administración da como resultado la mejoría de uno o más de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 50%.

En ciertas realizaciones, la enfermedad pulmonar intersticial no es una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias o enfermedad pulmonar obstructiva. Tales enfermedades pueden implicar inflamación del intersticio, el tejido y espacio alrededor de los sacos de aire de los pulmones. En ciertas relaciones, la enfermedad pulmonar intersticial no está causada por inflamación. Los síntomas de la enfermedad pulmonar intersticial incluyen, sin limitación, dificultad respiratoria (particularmente con el esfuerzo); fatiga; debilidad; pérdida de apetito; pérdida de peso; tos seca, no productiva (poca o ninguna producción de flemas); malestar en el pecho; respiración dificultosa; o evidencia de hemorragia en uno o ambos pulmones.

En la presente invención se proporcionan células madre placentarias para usar en un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno pulmonar intersticial (por ejemplo, una enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa), que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias. En una realización específica, la cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que, de forma permanente o transitoria, da como resultado una mejoría detectable o una disminución del empeoramiento de uno o más síntomas de dicha enfermedad pulmonar intersticial. En una realización específica, dicho síntoma es una capacidad por debajo de lo normal de un pulmón del individuo para difundir monóxido de carbono (por ejemplo, baja capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) en comparación con la normal). En ciertas realizaciones más específicas, dicho uno o más síntomas de enfermedad pulmonar intersticial comprende dificultad respiratoria (particularmente con el esfuerzo); fatiga; debilidad; pérdida de

apetito; pérdida de peso; tos seca, no productiva (poca o ninguna producción de flemas); malestar en el pecho; respiración dificultosa; o evidencia de hemorragia en uno o ambos pulmones.

5 En ciertas realizaciones específicas, dicha administración de células madre placentarias da como resultado una detectable mejoría en una o más medidas de la función pulmonar en dicho individuo, por ejemplo como se demuestra por espirometría, monitorización del flujo máximo, volumen espiratorio forzado, o similares. En una realización más específica, dicha administración da como resultado un aumento de al menos 5%, 10%, 15% ó 20% de difusión de monóxido de carbono, en comparación con la difusión de monóxido de carbono antes de la administración, en un pulmón de dicho individuo. En algunas otras realizaciones específicas, dicha administración de
10 células madre placentarias da como resultado una detectable mejoría en uno o más de una radiografía de tórax, tomografía computarizada, imágenes de resonancia magnética (MRI), broncoscopia o exploración similar (por ejemplo, mejoría visible en el aspecto del pulmón). En otra realización específica, dicha administración de células madre placentarias da como resultado una detectable mejoría en el nivel de dióxido de carbono detectable en la sangre (por ejemplo, el movimiento de niveles de CO₂ hacia dentro de un intervalo normal).

15 En una realización específica, la enfermedad pulmonar intersticial no está causada por lupus eritematoso. En una realización más específica, dicha enfermedad pulmonar intersticial no es enfermedad pulmonar intersticial difusa crónica.

20 En ciertas realizaciones, la enfermedad pulmonar intersticial es una enfermedad pulmonar intersticial con fibrosis (por ejemplo, una enfermedad pulmonar fibrótica), tal como fibrosis pulmonar intersticial. En ciertas realizaciones, la enfermedad pulmonar intersticial, por ejemplo, enfermedad pulmonar fibrótica, es neumonía pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar idiopática (alveolitis fibrosante criptogénica), pneumoconiosis, asbestosis, baritosis, fibrosis de bauxita, beriliosis, síndrome de Caplan, chalicosis, pneumoconiosis de los trabajadores del carbón, bagazosis, pulmón de criador de aves, o pulmón de granjero.

4.1.2 Tratamiento de enfermedades y trastornos pulmonares obstructivos

25 En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección pulmonar tratable usando células madre placentarias, es una enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo. Por tanto, en la presente invención se proporcionan células madre placentarias para usar en un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias a dicho individuo, por ejemplo al pulmón afectado de dicho individuo. En una realización específica, el método de tratamiento comprende evaluar a dicho individuo para mejorar en uno o más parámetros de la función pulmonar después de dicha administración (por ejemplo, de 7 a 30 días después), en donde dichos parámetros de la
30 función pulmonar son el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV₁); capacidad vital de volumen forzado (FVC); FEV₁/FVC; flujo espiratorio máximo (PEF); flujo espiratorio forzado de 25%-50% ó 25%-75% (flujo medio de aire que sale del pulmón durante la parte central de la espiración); tiempo espiratorio forzado (FET); capacidad pulmonar total (TLC); capacidad de difusión, monóxido de carbono (DLCO); o ventilación voluntaria máxima. En una realización más específica, dicha administración da como resultado la mejoría de uno de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 50%. En otra realización más específica, el método comprende identificar cualquiera de dichos parámetros que, antes de la administración, son menos del 80% de los valores esperados para un individuo de la misma altura y peso, y evaluar dichos parámetros después de dicha administración, en donde dicha administración da como resultado la mejoría de uno o más de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%,
40 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 50%.

45 En realizaciones específicas, la enfermedad pulmonar obstructiva es el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ARDS), asma, bronquiectasia, bronquiolitis, bronquiolitis, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), o enfisema. En otra realización específica, la enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo no está causado por una enfermedad autoinmune. En una realización más específica, dicha enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo no está causado por enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad de injerto contra el huésped.

50 Por tanto, en la presente invención se proporcionan células madre placentarias para usar en un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias. En una realización específica, la cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que, de forma permanente o transitoria, da como resultado una detectable mejoría en, o disminución del empeoramiento de, uno o más síntomas de dicha enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo.

55 En una realización específica, dicha enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo es enfermedad pulmonar obstructiva crónica, por ejemplo diagnosticada por una relación de volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁) a capacidad vital forzada (FVC) inferior a 0,7. En una realización más específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que da como resultado un detectable aumento en la relación FEV₁/FEC por encima de 0,7 después de la administración, por ejemplo, un aumento de 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, o más o más.

En otra realización específica, dicha enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo es el asma. En realizaciones más específicas, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias es una cantidad que da como resultado una detectable mejoría en uno o más síntomas del asma, por ejemplo obstrucción de las vías respiratorias, según se determina mediante espirometría o un medidor de flujo máximo.

5 El tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección pulmonar obstructiva puede comprender la administración de un segundo compuesto terapéutico. En realizaciones específicas, por ejemplo en donde la enfermedad, trastorno o afección pulmonar es el asma, la segunda composición terapéutica o segunda terapia puede comprender uno o más de un compuesto terapéutico inhalado o compuesto terapéutico tomado por vía oral, por ejemplo sin limitación, corticosteroides inhalados (por ejemplo hidrocortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, triamcinolona, beclometasona, acetato de fludrocortisona, acetato de desoxicortisona, aldosterona, o similares), o beta-agonistas inhalados (por ejemplo, salbutamol, levosalbutamol, terbutalina, pirbuterol, procaterol, metaproterenol, fenoterol, bitolterol, salmeterol, formoterol, bambuterol, clenbuterol, indacaterol, o similares), inhibidores de leucotrienos (por ejemplo, zileuton, MK-866, montelukast, zafirlukast, o similares).

10 En otras realizaciones específicas, en donde la enfermedad, trastorno o afección pulmonar es, por ejemplo, COPD, la segunda composición terapéutica o segunda terapia puede comprender uno o más de un beta-agonista inhalado (ver la lista de beta-agonistas enumerados en la discusión del tratamiento del asma, más arriba); o anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio (Atrovent), bromuro de oxitropio (Oxivent), tiotropio (Spiriva) o similares).

4.1.3 Tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones pulmonares causadas por una respuesta inmune

20 En ciertas realizaciones, se proporcionan en la presente invención células madre placentarias para usar en un método para tratar un pulmón de un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, una respuesta inmune perjudicial, deletérea, inapropiada o no deseada, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias a dicho individuo, por ejemplo a un pulmón afectado de dicho individuo. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno, o afección pulmonar es, por ejemplo, una enfermedad alérgica o autoinmune que afecta a los pulmones. En una realización específica, dicha enfermedad, trastorno o afección es un trastorno o enfermedad pulmonar asociada con, o causada por, lupus, por ejemplo lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, enfermedad de injerto contra el huésped, o artritis reumatoide (por ejemplo, enfermedad pulmonar reumatoide).

30 En una realización específica, el método de tratamiento comprende identificar en un individuo que tiene una respuesta inmune inapropiada, por ejemplo una enfermedad autoinmune, un síntoma de dicha respuesta inmune en el pulmón; administrar células madre placentarias a dicho individuo, por ejemplo al pulmón afectado de dicho individuo; y evaluar a dicho individuo para mejorar en uno o más parámetros de la función pulmonar después de dicha administración (por ejemplo, de 7 días a 30 días después), en donde dichos parámetros de la función pulmonar son el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁); capacidad vital de volumen forzado (FVC); FEV₁/FVC; flujo espiratorio máximo (PEF); flujo espiratorio forzado de 25%-50% ó 25%-75% (flujo medio de aire que sale del pulmón durante la parte central de la espiración); tiempo espiratorio forzado (FET); capacidad pulmonar total (TLC); capacidad de difusión, monóxido de carbono (DLCO); o ventilación voluntaria máxima. En una realización más específica, dicha administración da como resultado la mejoría de uno de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10%, o más. En una realización más específica, el método comprende identificar cualquiera de dichos parámetros que, antes de la administración, son menos del 80% de los valores esperados para un individuo de la misma altura y peso, y evaluar dichos parámetros después de dicha administración, en donde dicha administración da como resultado la mejoría de uno o más de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10%, o más.

45 En ciertas realizaciones, las células madre placentarias para usar en la invención suprimen una respuesta inmune cuando se ponen en contacto con una pluralidad de células inmunes (por ejemplo, células CD4⁺ T, células CD8⁺ T, o células asesinas naturales (NK)) *in vivo*, por ejemplo en un individuo afectado por dicha enfermedad, trastorno o afección que afecte a los pulmones. En diversas realizaciones específicas, dicho contacto es suficiente para suprimir una función inmune asociada con, o causante de, dicha enfermedad, trastorno o afección pulmonar en al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95%, en comparación con la función inmune en el individuo afectado en ausencia de las células madre placentarias.

55 La puesta en contacto de células placentarias, por ejemplo células madre placentarias, con células inmunes puede ocurrir *in vivo* en el contexto de, o como un complemento de, por ejemplo injerto o trasplante de uno o más tipos de tejidos a un individuo receptor. Tales tejidos pueden ser, por ejemplo, tejido pulmonar. En este sentido, las células madre placentarias se pueden usar para suprimir una o más respuestas inmunitarias de una o más células inmunes contenidas en el individuo receptor, dentro del tejido pulmonar trasplantado, o ambos. El contacto puede ocurrir antes, durante y/o después del injerto o trasplante. Por ejemplo, las células madre placentarias se pueden administrar en el momento del trasplante o injerto. Las células placentarias pueden también, o alternativamente, ser administradas antes del trasplante o injerto, por ejemplo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días antes del trasplante o injerto. Las células placentarias, por ejemplo células madre placentarias, pueden también, o alternativamente, ser administradas a un receptor de trasplante o injerto después del trasplante o injerto, por ejemplo

aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días después del trasplante o injerto. Preferiblemente, las células placentarias se ponen en contacto con las células inmunes antes de que sea detectable cualquier señal detectable o síntoma de una respuesta inmune, ya sea por el individuo receptor o el tejido trasplantado o injerto, por ejemplo una señal detectable o síntoma de enfermedad de injerto contra el huésped o inflamación detectable, es detectable.

5 El tratamiento de un individuo que tiene un trastorno, enfermedad o afección pulmonar asociada con, empeorada o causada por, una respuesta inmune no deseada o perjudicial puede comprender adicionalmente la administración, al individuo, de uno o más agentes inmunosupresores, particularmente en el contexto *in vivo*. En una realización, la pluralidad de células madre placentarias se pone en contacto con la pluralidad de células inmunes *in vivo* en un individuo, y una composición que comprende un agente inmunosupresor se administra al individuo que tiene la enfermedad, trastorno o afección de los pulmones. Son bien conocidos en la técnica agentes inmunosupresores e incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-receptores de células T (monoclonales o policlonales, o fragmentos de anticuerpos o sus derivados), anticuerpos anti-receptores de IL-2 (por ejemplo, Basiliximab (SIMULECT®) o daclizumab (ZENAPAX®)), anticuerpos anti-receptores de células T (por ejemplo, Muromonab-CD3), azatioprina, corticosteroides, ciclosporina, tacrolimus, micofenolato mofetilo, sirolimus, inhibidores de calcineurina, y similares. En una realización específica, el agente inmunosupresor es un anticuerpo neutralizante de proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α o MIP-1 β . Preferiblemente, el anticuerpo anti-MIP-1 α o MIP-1 β se administra en una cantidad suficiente para causar una reducción detectable en la cantidad de MIP-1 α y/o MIP-1 β en dicho individuo, por ejemplo en el momento del trasplante.

20 En ciertas realizaciones, un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección pulmonar se trata mediante la administración de células madre placentarias y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos, en cualquier momento durante la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, el individuo puede ser tratado inmediatamente después del diagnóstico, o a los 1, 2, 3, 4, 5, 6 días del diagnóstico, o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más semanas, ó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días después del diagnóstico. El individuo puede ser tratado una o varias veces durante el curso clínico de la enfermedad. El individuo puede ser tratado, según corresponda, durante un ataque agudo, durante la remisión, o durante una fase degenerativa crónica.

30 En una realización específica, el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección pulmonar relacionada con, o causada por, una respuesta inmune inapropiada, deletérea o perjudicial comprende la administración de una población de un segundo tipo de célula, por ejemplo células madre, además de las células madre placentarias. En una realización específica, dichas células madre son células madre mesenquimales, por ejemplo células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. En otras realizaciones, el segundo tipo de células son células madre multipotentes, células madre pluripotentes, células progenitoras, células madre hematopoyéticas, por ejemplo células madre hematopoyéticas CD34⁺ (por ejemplo, contenidas en la sangre no procesada de médula ósea o de cordón umbilical, o células aisladas de sangre de médula ósea o de cordón umbilical), células madre adulta, células madre embrionarias, o células germinales embrionarias. El segundo tipo de célula, por ejemplo célula madre mesenquimal, se puede administrar con las células madre placentarias en cualquier relación, por ejemplo una relación de aproximadamente 100:1, 75:1, 50:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 1:75 ó 1:100. Las células madre mesenquimales se pueden obtener comercialmente o de una fuente original, por ejemplo médula ósea, aspirado de médula ósea, tejido adiposo, y similares.

4.1.3.1 Trastornos pulmonares asociados con la enfermedad de injerto contra el huésped

40 En ciertas realizaciones, se proporcionan en la presente invención células madre placentarias para usar en un método para tratar a un individuo, por ejemplo un receptor de trasplante o individuo que recibirá, o ha recibido, un trasplante, que comprende administrar al individuo, por ejemplo a un pulmón afectado del individuo, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias. En ciertas realizaciones, el trasplante es un trasplante de pulmón o un injerto de una parte de un pulmón. En ciertas realizaciones, el trasplante es un trasplante de médula ósea. En realizaciones específicas, el receptor del trasplante tiene, está experimentando un síntoma de, o está en riesgo de desarrollar, la enfermedad de injerto contra el huésped (GVHD).

50 En una realización, dicho método de tratamiento comprende evaluar a un individuo por uno o más parámetros de la función pulmonar antes de un trasplante, por ejemplo un trasplante de órganos o trasplante de médula ósea, y, si dicho uno o más parámetros empeoran después de dicho trasplante, administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, en donde dichos parámetros de la función pulmonar son el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁); capacidad vital de volumen forzado (FVC); FEV₁/FVC; flujo espiratorio máximo (PEF); flujo espiratorio forzado de 25%-50% ó 25%-75% (flujo medio de aire que sale del pulmón durante la parte central de la espiración); tiempo espiratorio forzado (FET); capacidad pulmonar total (TLC); capacidad de difusión, monóxido de carbono (DLCO); o ventilación voluntaria máxima. En una realización más específica, dicha administración da como resultado una mejoría de uno de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de los valores esperados para un individuo de la misma altura y peso, o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, ó 10%, o más.

60 En realizaciones preferidas, dicho método comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, medio de cultivo condicionado por células madre placentarias, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que da por resultado una detectable mejoría en uno o más síntomas, o

retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada o causada por, o asociada con, trasplante o GVHD. En ciertas realizaciones, dicha administración da como resultado al menos la estabilización de uno o más síntomas de la GVHD; es decir, dicho uno o más síntomas no mejoran significativamente, pero tampoco empeoran significativamente. En realizaciones más específicas, dicho uno o más síntomas de la GVHD comprenden enfermedad pulmonar obstructiva (que incluye cualquiera de disnea sibilante y/o tos crónica).

En ciertas realizaciones, dicho método de tratamiento comprende una evaluación de la eficacia de la administración de las células madre placentarias. Por ejemplo, en una realización, el método de tratamiento de una enfermedad o trastorno pulmonar causado por, o asociado con, un trasplante o GVHD comprende (1) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, medio de cultivo condicionado por células madre placentarias; y (2) evaluar al individuo para mejoría detectable en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, GVHD. En ciertas realizaciones específicas, dicho método de tratamiento comprende una segunda (o adicional) administración de células madre placentarias a dicho individuo, opcionalmente seguida por una segunda (o adicional) evaluación del individuo para una mejoría detectable en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, la GVHD.

La invención no está limitada por la naturaleza del donante o receptor. El trasplante puede cruzar líneas de especies. En realizaciones preferidas, el donante y receptor son las mismas especies, por ejemplo ambas son humanas. El receptor del trasplante puede ser total o parcialmente alogénico al donante. El trasplante puede ser autólogo. Los receptores o donantes de trasplantes pueden ser menores de 5 años de edad, de 1 a 10 años, de 5 a 15 años, de 10 a 20 años, de 15 a 25 años, de 20 a 30 años, de 25 a 35 años, de 30 a 40 años, de 35 a 45 años, de 40 a 50 años, de 45 a 55 años, de 50 a 60 años, de 55 a 65 años, de 60 a 70 años, o de 70 años de edad o más.

Las células madre placentarias se pueden usar para tratar una o más manifestaciones pulmonares de la GVHD en individuos que presentan síntomas indicativos de una calificación o estadificación de la enfermedad como se muestra en las Tablas 1 y 2, a continuación. La GVHD se califica generalmente según la gravedad de los síntomas. Por ejemplo, en una realización, los síntomas de la GVHD se estadifican, y la GVHD se califica de 0 (sin GVHD) – IV (GVHD que amenaza la vida) según la piel, hígado, y/o síntomas intestinales, como se muestra en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Estadificación de enfermedad aguda de injerto contra el huésped

Etapa	Piel	Hígado (nivel de bilirrubina, mg/dL)	Intestino
+	Erupción maculopapular en <25% de la superficie corporal	2-3	Diarrea 500-1000 mL/d o náuseas persistentes
++	Erupción maculopapular en 25-50% de la superficie corporal	3-6	Diarrea 1000-1500 mL/d
+++	Eritrodermia generalizada	6-15	Diarrea >1500 mL/d
++++	Descamación y ampollas	>15	Dolor con o sin íleo

Tabla 2. Calificación de GVHD aguda

Calificación global	Etapa			
	Piel	Hígado	Intestino	Deterioro funcional
0 (Ninguna)	0	0	0	0
I (Leve)	+ a ++	0	0	0
II (Moderada)	+ a +++	+	+	+
III (Grave)	++ a +++	++ a +++	++ a +++	++
IV (Amenazadora de la vida)	++ a ++++	++ a ++++	++ a ++++	+++

En realizaciones específicas, las células madre placentarias se administran al individuo dentro de los 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 días antes del trasplante. En otra realización específica, las células madre placentarias se administran simultáneamente con el trasplante. En otra realización específica, las células madre placentarias se administran dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 días después del trasplante. La administración de células madre placentarias se puede realizar varias veces, por ejemplo varias veces antes, con o después del trasplante, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización, las células madre placentarias se administran en cualquier momento después del trasplante cuando la enfermedad de injerto contra el huésped de Grado II o peor se manifiesta en el individuo (receptor de trasplante).

En otra realización del método, al individuo, por ejemplo al receptor del trasplante o un individuo que recibirá un trasplante, se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias y, adicionalmente, al menos otro agente terapéutico. En una realización específica, el agente terapéutico es globulina atimocítica,

micofenolato mofetilo, sirolimus, Campath-1H, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), cortisona, hidrocortisona, predisona, o metilprednisona. En otra realización específica, el agente terapéutico es un agente inmunosupresor o agente inmunomodulador. Los agentes inmunosupresores y agentes inmunomoduladores que se pueden usar como segundos agentes para tratar la GVHD, por ejemplo para tratar una manifestación de la GVHD en los pulmones incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A, antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxispergualina, brequinar, malononitriloamindes (por ejemplo, leflunamida), moduladores de receptores de células T, moduladores de receptores de citoquinas, péptidos miméticos, y antibióticos (por ejemplo, fragmentos humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, Fvs, ScFvs, Fab o F(ab)₂ o fragmentos de unión a epítipo), moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos antisentido y triples hélices), moléculas pequeñas, compuestos orgánicos, y compuestos inorgánicos. En particular, los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxano, Immuran, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxispergualina, brequinar, malononitriloamindes (por ejemplo, leflunamida), moduladores de receptores de células T, y moduladores de receptores de citoquinas. Los ejemplos de moduladores de receptores de células T incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-receptores de células T (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 (por ejemplo, cM-T412 (Boehringer)), IDEC-CE9.1s (IDEC y SKB), mAB 4162W94, ORTHOCLONE® y OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticuerpos anti-CD3 (por ejemplo, NUVION® (Product Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson), o Rituxan (IDEC)), anticuerpos anti-CD5 (por ejemplo, un inmunocjugado anti-CD5 unido a ricina), anticuerpos anti-CD7 (por ejemplo CHH-380 (Novartis)), anticuerpos anti-CD8, anticuerpos monoclonales anti-ligando CD40 (por ejemplo, IDEC-131 (IDEC)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH® 1H (Ilex)), anticuerpos anti-CD2, anticuerpos anti-CD1a (por ejemplo, Xanelim (Genentech)), y anticuerpos anti-B7 (por ejemplo, IDEC-114) (IDEC)), inmunoglobulina-CTLA4, talidomida, o uno de los compuestos de la Sección 5.6.6 anterior. En una realización específica, un modulador de receptor de células T es un antagonista de CD2. En otras realizaciones, un modulador de receptor de células T no es un antagonista de CD2. En otra realización específica, el agente es el anticuerpo MEDI-501 (T10B9). En otra realización específica, un modulador de receptor de células T es una molécula de unión a CD2, preferiblemente MEDI-507. En otras realizaciones, un modulador de receptor de células T no es una molécula de unión a CD2. Cualquier combinación de los agentes terapéuticos anteriores, adecuada para el tratamiento de la GVHD o un síntoma de la GVHD, se puede administrar al individuo. Tales agentes terapéuticos se pueden administrar en cualquier combinación con las células madre placentarias, medio de cultivo condicionado por células placentarias, células de cordón umbilical, por ejemplo células madre de cordón umbilical, y/o medio de cultivo condicionado por células de cordón umbilical, al mismo tiempo o como un curso separado de tratamiento.

4.1.3.2 Trastornos pulmonares asociados con artritis reumatoide

En otra realización, en la presente invención se proporcionan células madre placentarias para usar en un método para tratar a un individuo que tiene, o está experimentando un síntoma de, o está en riesgo de desarrollar, una enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, artritis reumatoide (RA), que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, o medio de cultivo condicionado por células madre placentarias, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que da como resultado una detectable mejoría en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por RA. En ciertas realizaciones, dicha administración da como resultado al menos la estabilización de uno o más síntomas de RA que se manifiestan en un pulmón del individuo; es decir, dicho uno o más síntomas no mejoran significativamente, pero tampoco empeoran significativamente.

En ciertas realizaciones, dicho método de tratamiento comprende identificar, en un individuo que tiene RA, un síntoma de dicha RA en el pulmón; administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias a dicho individuo, por ejemplo al pulmón afectado de dicho individuo; y evaluar a dicho individuo para mejorar en uno o más parámetros de la función pulmonar después de dicha administración (por ejemplo, de 7 días a 30 días después), en donde dichos parámetros de la función pulmonar son el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV₁); capacidad vital de volumen forzado (FVC); FEV₁/FVC; flujo espiratorio máximo (PEF); flujo espiratorio forzado de 25%-50% ó 25%-75% (flujo medio de aire que sale del pulmón durante la parte central de la espiración); tiempo espiratorio forzado (FET); capacidad pulmonar total (TLC); capacidad de difusión, monóxido de carbono (DLCO); o ventilación voluntaria máxima. En una realización más específica, dicha administración da como resultado la mejoría de uno de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 50%. En una realización más específica, el método comprende identificar cualquiera de dichos parámetros que, antes de la administración, son menos del 80% de los valores esperados para un individuo de la misma altura y peso, y evaluar dichos parámetros después de dicha administración, en donde dicha administración da como resultado la mejoría de uno de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 50%.

En una realización específica, la administración es suficiente para causar una detectable mejoría en uno o más síntomas de la RA, o afección adjunta a la RA, o suficiente para reducir de manera detectable la aparición de uno o más síntomas de la RA o afección adjunta a la RA, en un pulmón del individuo, por ejemplo respiración dolorosa,

dificultad respiratoria (por ejemplo, debido a derrame pleural), desarrollo o presencia de nódulos pulmonares (nódulos reumatoides), cicatrización de los pulmones (fibrosis pulmonar o bronquiolitis obliterante), infección viral del pulmón, fibrosis de los pulmones (por ejemplo, como una consecuencia de la terapia con metotrexato).

5 En ciertas realizaciones, dicho método de tratamiento comprende una evaluación de la eficacia de la administración de las células madre placentarias. Por ejemplo, en una realización, el método para tratar una enfermedad o trastorno pulmonar causado por, o asociado con, RA comprende (1) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, y/o medio de cultivo condicionado por células madre placentarias; y (2) evaluar al individuo para una mejoría detectable en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, RA. En ciertas realizaciones específicas, dicho método de tratamiento comprende una segunda (o adicional) administración de células madre placentarias a dicho individuo, opcionalmente seguida por una segunda (o adicional) evaluación del individuo para una detectable mejoría en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, RA.

15 En una realización específica, al individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con RA se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, o medio de cultivo condicionado por células madre placentarias, y adicionalmente al menos otro agente terapéutico, por ejemplo un analgésico o un agente antiinflamatorio. En realizaciones más específicas, el al menos otro agente terapéutico es un fármaco antiinflamatorio modificador de la enfermedad (DMARD), por ejemplo un xenobiótico (por ejemplo, azatioprina, ciclosporina A, D-penicilamina, sales de oro, hidroxycloquina, leflunomida, metotrexato, minociclina o sulfasalazina) o un agente biológico (por ejemplo, bloqueadores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), tales como etanercept (ENBREL®), infliximab (REMICADE®), adalimumab (HUMIRA®); bloqueadores de interleuquina-1; anticuerpo (CD20) anti-células B (por ejemplo, rituximab o RITUXAN®); o bloqueadores de la activación de células T (por ejemplo, abatacept u ORENCIA®). En otra realización más específica, el agente analgésico o antiinflamatorio es un glucocorticoide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, acetaminofeno, ibuprofeno, aspirina, un opiáceo, o lidocaína (tópica). Tales agentes terapéuticos se pueden administrar en cualquier combinación con las células madre placentarias; al mismo tiempo o como un curso separado de tratamiento.

25 En una realización específica, una pluralidad de las células madre placentarias administradas a un individuo que tiene RA, se diseñan genéticamente para expresar un polipéptido terapéutico para la RA. En una realización más específica, el polipéptido terapéutico para la RA es IL-1Ra (antagonista del receptor de interleuquina-1). En otra realización más específica, el polipéptido terapéutico para la RA es una proteína de fusión que comprende IL-1Ra y DHFR (dihidrolato reductasa). En una realización más específica, las células madre placentarias se transforman con un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión IL-1Ra-DHFR, en donde la expresión de la proteína de fusión se refuerza por un antifolato, por ejemplo metotrexato. Incluso en una realización más específica, el ácido nucleico codifica IL-1Ra-DHFR-IRES-Luc, en donde IRES es un sitio interno de entrada al ribosoma, y Luc es luciferasa. En otra realización específica, dicho ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que permite el control de la expresión del IL-1Ra o el polipéptido de fusión IL-1Ra-DHFR.

4.1.3.3. Trastornos pulmonares asociados con lupus eritematoso

40 En otra realización, en la presente invención se proporcionan células madre placentarias para usar en un método para tratar a un individuo que tiene, o está experimentando un síntoma de, una enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, lupus eritematoso (LE), que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, o medio de cultivo condicionado por células madre placentarias, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que da como resultado una detectable mejoría en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por LE. En ciertas realizaciones, dicha administración da como resultado al menos la estabilización de uno o más síntomas de LE que se manifiestan en el pulmón del individuo; es decir, dicho uno o más síntomas no mejoran significativamente, pero tampoco empeoran significativamente. En realizaciones específicas, dichos síntomas comprenden pleuritis (con o sin derrame), neumonitis por lupus o enfermedad pulmonar intersticial difusa crónica.

50 En ciertas realizaciones, dicho método de tratamiento comprende identificar, en un individuo que tiene LE, un síntoma de dicho LE en el pulmón; administrar células madre placentarias a dicho individuo, por ejemplo al pulmón afectado de dicho individuo; y evaluar a dicho individuo para mejorar en uno o más parámetros de la función pulmonar después de dicha administración (por ejemplo, de 7 días a 30 días después), en donde dichos parámetros de la función pulmonar son el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV₁); capacidad vital de volumen forzado (FVC); FEV₁/FVC; flujo espiratorio máximo (PEF); flujo espiratorio forzado de 25%-50% ó 25%-75% (flujo medio de aire que sale del pulmón durante la parte central de la espiración); tiempo espiratorio forzado (FET); capacidad pulmonar total (TLC); capacidad de difusión, monóxido de carbono (DLCO); o ventilación voluntaria máxima. En una realización más específica, dicha administración da como resultado la mejoría de uno o más de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 50%. En una realización más específica, dicho método comprende identificar cualquiera de dichos parámetros que, antes de la administración, son menos del 80% de los valores esperados para un individuo de la misma altura y peso, y evaluar dichos parámetros después de dicha administración, en donde dicha administración

da como resultado la mejoría de uno o más de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 50%.

5 En ciertas realizaciones, dicho método de tratamiento comprende una evaluación de la eficacia de la administración de las células madre placentarias. Por ejemplo, en una realización, dicho método para tratar una enfermedad o trastorno pulmonar causado por, o asociado con, LE comprende (1) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, o medio de cultivo condicionado por células madre placentarias, y (2) evaluar al individuo para una detectable mejoría en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, LE. En ciertas realizaciones específicas, dicho método de tratamiento comprende una segunda (o adicional) administración de células madre
10 placentarias a dicho individuo, opcionalmente seguida por una segunda (o adicional) evaluación del individuo para una detectable mejoría en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, LE.

4.1.3.4 Trastornos pulmonares asociados con esclerodermia

15 En otra realización, en la presente invención se proporcionan células madre placentarias para usar en un método para tratar a un individuo que tiene, o está experimentando un síntoma de, una enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, esclerodermia, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias, o medio de cultivo condicionado por células madre placentarias, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que da como resultado una detectable mejoría en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad,
20 trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, esclerodermia. En ciertas realizaciones, dicha administración da como resultado al menos la estabilización de uno o más síntomas de esclerodermia que se manifiestan en un pulmón del individuo; es decir, dicho uno o más síntomas no mejoran significativamente, pero tampoco empeoran significativamente. En realizaciones específicas, dichos síntomas comprenden disnea (dificultad respiratoria), enfermedad pulmonar intersticial (también denominada alveolitis fibrosante o fibrosis pulmonar) o enfermedad vascular pulmonar (sola o incluyendo hipertensión pulmonar).
25

En ciertas realizaciones, dicho método de tratamiento comprende identificar, en un individuo que tiene esclerodermia, un síntoma de dicha esclerodermia en el pulmón; administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias a dicho individuo, por ejemplo al pulmón afectado de dicho individuo; y evaluar a dicho individuo para mejorar en uno o más parámetros de la función pulmonar después de dicha administración (por ejemplo, de 7 días a 30 días después), en donde dichos parámetros de la función pulmonar son el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV₁); capacidad vital de volumen forzado (FVC); FEV₁/FVC; flujo espiratorio máximo (PEF); flujo espiratorio forzado de 25%-50% ó 25%-75% (flujo medio de aire que sale del pulmón durante la parte central de la espiración); tiempo espiratorio forzado (FET); capacidad pulmonar total (TLC); capacidad de difusión, monóxido de carbono (DLCO); o ventilación voluntaria máxima. En una realización más específica, dicha
30 administración da como resultado la mejoría de uno de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 50%. En una realización más específica, el método comprende identificar cualquiera de dichos parámetros que, antes de la administración, son menos del 80% de los valores esperados para un individuo de la misma altura y peso, y evaluar dichos parámetros después de dicha administración, en donde dicha administración da como resultado la mejoría de uno de dichos parámetros de la función pulmonar (1) al 80% o más de lo esperado; o (2) en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 50%.
40

En ciertas realizaciones, dicho método de tratamiento comprende una evaluación de la eficacia de la administración de las células madre placentarias. Por ejemplo, en una realización, el método de tratamiento de una enfermedad o trastorno pulmonar causado por, o asociado con, esclerodermia comprende (1) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células placentarias o células de cordón umbilical, es decir, células madre placentarias, o medio de cultivo condicionado por células madre placentarias; y (2) evaluar al individuo para mejoría detectable en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, esclerodermia. En ciertas realizaciones específicas, dicho método de
45 tratamiento comprende una segunda (o adicional) administración de células madre placentarias a dicho individuo, opcionalmente seguida por una segunda (o adicional) evaluación del individuo para una mejoría detectable en uno o más síntomas, o retraso de la aparición de uno o más síntomas, de la enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, esclerodermia.
50

En una realización específica, dicho individuo se evalúa para la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO), y la mejoría en el individuo comprende una mejoría significativa en la DLCO tras la administración de células madre placentarias (por ejemplo, un aumento de al menos 3, 4, 5 ó más puntos porcentuales) en
55 comparación con la DLCO antes de la administración. En otra realización específica, a dicho individuo se le evalúa la capacidad vital forzada (FVC), y la mejoría en el individuo comprende un aumento en la FVC de al menos 10%, al menos 15% o al menos 20% después de la administración de las células madre placentarias en comparación con la FVC antes de la administración, por ejemplo durante un periodo de al menos 1, 2, 3, ó 4 semanas, ó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 meses después de la administración.

En otra realización específica, se evalúa al individuo para cicatrización pulmonar o hipertensión pulmonar usando, por ejemplo, tomografía computarizada de alta resolución de los pulmones, lavado broncoalveolar, y/o biopsia pulmonar quirúrgica.

5 En una realización específica, al individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con RA se le administran células madre placentarias, o medio de cultivo condicionado por células madre placentarias, y adicionalmente al menos otro agente terapéutico. En realizaciones más específicas, el agente terapéutico comprende, sin limitación, un inhibidor de la síntesis de colágeno y/o reticulación de colágeno (por ejemplo, penicilamina), un esteroide (por ejemplo, prednisona), ciclofosfamida (por ejemplo, CYTOXAN®), una combinación de ciclofosfamida y un esteroide, una combinación de ciclofosfamida y azatioprina, un antifibrótico (por ejemplo, interferón gamma (IFN- γ), una antiendotelina (por ejemplo, Bosentan (TRACLEER®)), un análogo de prostaciclina (por ejemplo, epoprostenol (FLOLAN®), treprostnil (REMODULIN®)), y/o un antagonista de receptor de endotelina (por ejemplo, receptor B de endotelina) (por ejemplo, sitaxentan, ambrisentan (LETAIRIS™)).

4.1.3.5 Determinación del potencial inmunosupresor de las células placentarias

15 En realizaciones opcionales, la capacidad de una población particular de células madre placentarias para la inmunosupresión se determina antes de su uso, por ejemplo antes de la administración a un individuo que tenga una enfermedad, trastorno o afección pulmonar asociada con, o causada por, una respuesta inmune inapropiada o no deseada. Por ejemplo, se puede usar la MLR para determinar la capacidad inmunosupresora de una población particular de células madre placentarias, por ejemplo una dosis particular de células madre placentarias. Se conocen bien en la técnica procedimientos para realizar la MLR y ensayos de regresión. Ver, por ejemplo, Schwarz, "The Mixed Lymphocyte Reaction: An In Vitro Test for Tolerance," *J. Exp. Med.* 127(5):879-890 (1968); Lacerda *et al.*, "Human Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Home Preferentially to and Induce Selective Regressions of Autologous EBV-Induced B Lymphoproliferations in Xenografted C.B-17 Scid/Scid Mice," *J. Exp. Med.* 183:1215-1228 (1996). En una realización preferida, se realiza una MLR en la que una pluralidad de células madre placentarias se ponen en contacto con una pluralidad de células inmunes (por ejemplo, linfocitos, por ejemplo, linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y/o CD8⁺). Por ejemplo, una pluralidad de células placentarias se puede probar en una MLR que comprende combinar células T CD4⁺ o CD8⁺, células dendríticas (DC) y células placentarias en una relación de aproximadamente 10:1:2, en donde las células T se tiñen con un colorante tal como, por ejemplo, CFSE que se reparte en las células hijas, y en donde las células T se dejan que proliferen durante aproximadamente 6 días. La pluralidad de células placentarias es inmunosupresora si la proliferación de células T a los 6 días en presencia de células placentarias se reduce de forma detectable en comparación con la proliferación de células T en presencia de DC y ausencia de células placentarias. En tal MLR, las células placentarias se descongelan o se recogen del cultivo. Aproximadamente 20.000 células placentarias, por ejemplo células madre placentarias, se resuspenden en 100 μ l de medio (RPMI 1640, tampón HEPES 1 mM, antibióticos, y suero humano combinado al 5%), y se dejan adherir al fondo de un pocillo durante 2 horas. Las células T CD4⁺ y/o CD8⁺ se aíslan de las células mononucleares de sangre periférica completa usando bolas magnéticas Miltenyi. Las células se tiñen con CFSE, y se añade por pocillo un total de 100.000 células T (células T CD4⁺ solas, células CD8⁺ solas, o cantidades iguales de células T CD4⁺ y CD8⁺). El volumen del pocillo se lleva a 200 μ l y la MLR se deja que continúe.

4.1.4 Tratamiento de otras enfermedades o trastornos pulmonares

40 También se proporcionan en la presente invención células madre placentarias para usar en métodos para tratar enfermedades, trastornos o afecciones pulmonares que surgen por otras causas, que comprenden administrar a un individuo que tiene dicha enfermedad, trastorno o afección, por ejemplo a un pulmón afectado de dicho individuo, una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre placentarias. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, en la presente invención se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección que afecta a los pulmones, en donde dicha enfermedad, trastorno o afección pulmonar es una lesión pulmonar aguda. En realizaciones específicas, dicha lesión pulmonar aguda es uno o más de traumatismo físico, lesión debida a toxicidad farmacológica o quimioterapéutica (por ejemplo, toxicidad debida al tratamiento con bleomicina, ciclofosfamida, nitrofurantoína, metotrexato, terapia de combinación de 5-fluorouracilo y oxaliplatino o similares), una lesión inducida por radiación, una lesión química, por ejemplo una quemadura química, inhalación de humo, exposición a una sustancia tóxica, o neumonía inducida químicamente.

50 En algunas otras realizaciones, dicha enfermedad, trastorno o afección pulmonar es una lesión causada por una enfermedad neoplásica o paraneoplásica.

En otras realizaciones más, la enfermedad, trastorno o afección que afecta al pulmón es una infección viral o bacteriana del pulmón (por ejemplo, neumonía), una enfermedad pulmonar infecciosa o fibrosis quística.

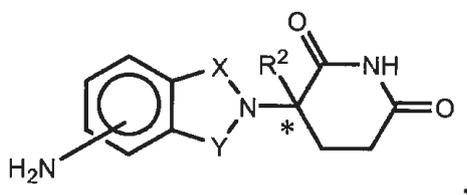
55 En realizaciones específicas, la enfermedad, trastorno o afección pulmonar es una enfermedad pulmonar medioambiental, una enfermedad granulomatosa, una enfermedad obstructiva, una enfermedad vascular, una neoplasia o un trastorno pleural.

4.1.5 Segundas composiciones terapéuticas y segundas terapias

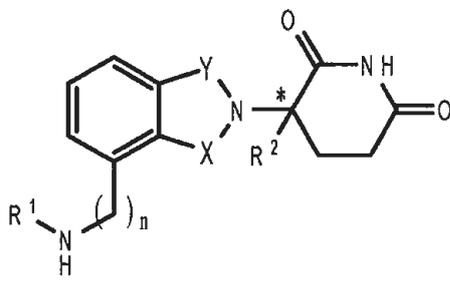
En cualquiera de los anteriores aspectos de la invención, el método puede comprender la administración de una segunda composición terapéutica o segunda terapia. Las segundas composiciones terapéuticas o segundas terapias pueden consistir en, o comprender, las segundas composiciones terapéuticas específicas o segundas terapias enumeradas anteriormente para las enfermedades, trastornos o afecciones relacionadas con los pulmones discutidas anteriormente en las Secciones 4.1.2-4.1.4. Sin embargo, la enumeración de segundos compuestos terapéuticos específicos o segundas terapias en los métodos para tratar las anteriores enfermedades específicas, no se pretende que sea exclusiva. Por ejemplo, cualquiera de las enfermedades, trastornos o afecciones discutidas en la presente memoria se puede tratar con cualquiera de los compuestos antiinflamatorios o compuestos inmunosupresores descritos en la presente memoria.

En realizaciones en las que se administran células madre placentarias con un segundo agente terapéutico, por ejemplo un segundo tipo de célula, las células madre placentarias y el segundo agente terapéutico se pueden administrar al mismo tiempo o en diferentes momentos, por ejemplo las administraciones pueden tener lugar dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, ó 50 minutos entre sí, ó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, ó 22 horas de diferencia entre sí, ó dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 días entre sí.

Dicha segunda terapia puede comprender un compuesto inmunomodulador, en donde el compuesto inmunomodulador tiene la estructura



en donde uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es C=O o CH₂, y R² es hidrógeno o alquilo inferior, o una sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiómero, diastereoisómero, racemato farmacéuticamente aceptables, o mezcla de estereoisómeros de los mismos. En otra realización más específica, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



en donde uno de X e Y es C=O y el otro es CH₂ o C=O;

R¹ es H, alquilo(C₁-C₈), cicloalquilo(C₃-C₇), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, alquil(C₁-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R^{3'}, C(S)NR³R^{3'} o alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵;

R² es H, F, bencilo, alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈), o alquino(C₂-C₈);

R³ y R^{3'} son independientemente alquilo(C₁-C₈), cicloalquilo(C₃-C₇), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquil(C₀-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵;

R⁴ es alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), alquil(C₁-C₄)-OR⁵, bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), o alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅);

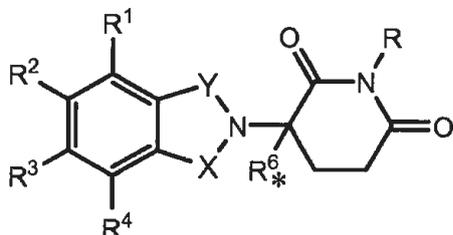
R⁵ es alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo, o heteroarilo(C₂-C₅);

cada caso de R⁶ es independientemente H, alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo, heteroarilo(C₂-C₅), o alquil(C₀-C₈)-C(O)O-R⁵ o los grupos R⁶ pueden unirse para formar un grupo heterocicloalquilo;

n es 0 ó 1;

* representa un centro de carbono quiral;

o una sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiómero, diastereoisómero, racemato, farmacéuticamente aceptables, o mezcla de sus estereoisómeros. Dicho compuesto inmunomodulador puede ser un compuesto que tiene la estructura



5

en donde:

uno de X e Y es C=O y el otro es CH₂ o C=O;

R es H o CH₂OCOR';

10 (i) cada uno de R¹, R², R³, o R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxilo de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, o R⁴ es nitro o -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³, o R⁴ son hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 carbonos

R⁶ hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro;

R' es R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹);

15 R⁷ es m-fenileno o p-fenileno o -(C_nH_{2n})- en donde n tiene un valor de 0 a 4;

cada uno de R⁸ y R⁹ tomados independientemente uno de otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ tomados conjuntamente son tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂X₁CH₂CH₂- en donde X₁ es -O-, -S-, o -NH-;

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de a 8 átomos de carbono, o fenilo; y

20 * representa un centro de carbono quiral;

o una sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiómero, diastereoisómero, racemato, farmacéuticamente aceptables, o mezcla de sus estereoisómeros.

25 El compuesto inmunomodulador puede ser 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona (lanalidomida); 3-(4'aminolisindolin-1'-ona)-1-piperidin-2,6-diona; 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1 ,3-diona (pomalidomida); o α-(3-aminoftalimido)glutarimida (lenalidomida).

30 Se pueden administrar células madre placentarias a un individuo que padece una enfermedad, trastorno o afección pulmonar en forma de una composición farmacéutica, por ejemplo una composición farmacéutica adecuada para inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal. Las células madre placentarias se pueden administrar en una sola dosis, o en múltiples dosis. Cuando las células madre placentarias se administran en dosis múltiples, las dosis pueden ser parte de un régimen terapéutico diseñado para aliviar uno o más síntomas agudos de una enfermedad, afección, o trastorno pulmonar, o puede ser parte de un régimen terapéutico a largo plazo diseñado para prevenir, o disminuir la gravedad, de un curso crónico de la enfermedad. En realizaciones en las que se administran células madre placentarias con un segundo agente terapéutico, o con un segundo tipo de células, las células madre placentarias y segundo agente terapéutico y/o segundo tipo de células se pueden administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes, por ejemplo, las administraciones pueden tener lugar dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, ó 50 minutos entre sí, ó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ó 22 horas de diferencia entre sí, o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 días entre sí.

4.1.6 Administración de células placentarias

40 La administración de las células madre placentarias puede ser por cualquier ruta médicamente aceptable. En realizaciones específicas, las células madre placentarias se administran por vía intravenosa, intraarterial, parenteral, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, o similar. Las células madre placentarias se pueden administrar sistémicamente, o directamente a un área afectada del pulmón. En ciertas realizaciones, las células madre placentarias se administran al individuo por inhalación, por ejemplo en un pulverizador, aerosol, por ventilación

externa o mecánica, o por aplicación directa (por ejemplo, inyección o aplicación tópica) a una parte del pulmón, por ejemplo la tráquea, bronquios, bronquiolos, lóbulos, alvéolos, o similares.

Para administración in vivo, se pueden formular células madre placentarias como una composición farmacéutica, como se describe a continuación.

5 En una realización, al individuo se le administra una dosis de aproximadamente 200 millones de células placentarias. Sin embargo, la dosificación puede variar de acuerdo con las características físicas del individuo, por ejemplo el peso, y puede variar de 1 millón a 10.000 millones de células placentarias, por ejemplo células madre placentarias, por dosis, preferiblemente entre 10 millones y 1.000 millones por dosis, o entre 100 millones y 50 millones de células madre placentarias, por dosis.

10 La administración durante un curso de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección pulmonar puede comprender una sola administración de células madre placentarias, o múltiples administraciones de células madre placentarias. Si se usa más de una administración de células madre placentarias en el curso del tratamiento, al individuo se le puede dar el mismo número aproximado de células madre placentarias, por administración, o se le puede dar números diferentes de células madre placentarias. Por ejemplo, en una
15 realización, a un individuo que padece una enfermedad, trastorno o afección pulmonar se le administra una dosis inicial relativamente grande de células madre placentarias, mientras que las administraciones posteriores comprenden la administración de un número relativamente menor de células madre placentarias, por ejemplo 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% del número de células de la dosis inicial.

20 4.2. Células placentarias y poblaciones de células placentarias

Las células madre placentarias para usar en métodos de tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones pulmonares, proporcionados en la presente invención comprenden la administración de células madre placentarias a un individuo que tiene la enfermedad, trastorno o afección. Las células madre placentarias, útiles en los métodos de
25 tratamiento descritos en la presente memoria, y los métodos para obtener y cultivar tales células, se describen por ejemplo en los Nos. de patente de EE.UU. 7.045.148; 7.255.879; 7.311.904; y 7.311.905; y las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. Nos. 2007/0275362 y 2008/0226595.

Las células madre placentarias pueden ser de origen fetal o materno (es decir, pueden tener el genotipo de la madre o el feto). Las poblaciones de células madre placentarias, o poblaciones de células que comprenden células placentarias, pueden comprender células placentarias que son únicamente de origen fetal o materno, o pueden
30 comprender una población mixta de células placentarias de origen tanto fetal como materno. Las células madre placentarias, y las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias, pueden identificarse y seleccionarse por las características morfológicas, de marcadores y de cultivo que se analizan a continuación.

4.2.1 Características físicas y morfológicas

Las células madre placentarias útiles en los métodos para tratar enfermedades, trastornos o afecciones pulmonares descritos en la presente memoria, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato de cultivo tisular, por ejemplo, la superficie del recipiente de cultivo tisular (por ejemplo, plástico de cultivo tisular). Las células en el cultivo adoptan un aspecto generalmente fibroblastoide, estrellado, con una serie de procesos citoplásmicos que se extienden desde el cuerpo celular central. Sin embargo, las células son morfológicamente diferenciables de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones. Por ejemplo, las células
40 generalmente muestran un mayor número de tales procesos que los fibroblastos desarrollados en las mismas condiciones. Morfológicamente, las células también se distinguen de las células madre hematopoyéticas, que generalmente adoptan una morfología en cultivo más redondeada, o adoquinada.

4.2.2 Marcadores de la superficie celular, moleculares y genéticos

Las células madre placentarias aisladas, y las poblaciones de células madre placentarias aisladas, útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria, son células placentarias humanas adherentes al plástico de cultivo tisular o células de cordón umbilical que tienen características de células multipotentes o células madre, y expresan una pluralidad de marcadores que pueden ser útiles para identificar y/o aislar las células, o poblaciones de células que comprenden las células madre. Las células madre placentarias aisladas, y las poblaciones celulares que comprenden células madre placentarias (es decir, dos o más células aisladas), descritas en la presente memoria,
50 incluyen células y poblaciones celulares que contienen células obtenidas directamente de la placenta, o cualquier parte de la misma (por ejemplo, amnios, corión, cotiledones placentarios, y similares) o cordón umbilical. Las poblaciones de células madre placentarias aisladas también incluyen poblaciones (es decir, dos o más) de células madre placentarias aisladas en cultivo, y una población en un recipiente, por ejemplo una bolsa.

Las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria no son células mesenquimales derivadas de la médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, o células mesenquimales obtenidas de sangre del cordón umbilical, sangre placentaria, o sangre periférica. Como se usa en la presente memoria la expresión "células madre placentarias" abarca cualquiera de las células madre o células multipotentes descritas en

esta sección. Las células madre placentarias aisladas tampoco son trofoblastos. Los trofoblastos en cultivo forman típicamente células multinucleadas llamadas sincitiotrofoblastos; en cambio, las células madre placentarias no forman células multinucleadas en cultivo, sino que se expanden como una población de células uninucleares, similar a la expansión de los fibroblastos.

5 En ciertas realizaciones, las células madre placentarias son células madre aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺. En algunas otras realizaciones, dichas células madre placentarias son células multipotentes aisladas. En una realización, las células madre placentarias son CD34⁻, CD10⁺, CD200⁺, y CD105⁺ según se detectan por citometría de flujo. En otra realización específica, las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo neural, células de un fenotipo osteogénico, y/o células de un fenotipo condrogénico. En una realización más específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas son adicionalmente CD90⁺ o CD45⁻; según se detectan por citometría de flujo. En otra realización más específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas son adicionalmente CD90⁺ y CD45⁻, según se detectan por citometría de flujo, es decir, las células son CD34⁻, CD10⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺. En una realización más específica, dichas células CD34⁻, CD10⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente CD80⁻ y CD86⁻.

En una realización específica, cualquiera de las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ descritas anteriormente son adicionalmente una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización más específica, las células son adicionalmente CD44⁺. En otra realización específica de cualquiera de las células madre placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas anteriores, las células son adicionalmente una o más de CD117⁻, CD133⁻, KDR (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, o ligando 1 de muerte programada (PDL1)⁺, o cualquiera de sus combinaciones.

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

En ciertas realizaciones, las células son adicionalmente una o más de SSEA3⁻, SSEA4⁻ o ABC-p⁺. Las células aisladas pueden expresar también HLA-ABC (MHC-1). Estos marcadores se pueden usar, en cualquier combinación, para identificar las células aisladas, por ejemplo células madre aisladas o células multipotentes aisladas y para distinguir las células aisladas de otros tipos de células. La falta de expresión de CD34, CD38 y/o CD45, por ejemplo, identifica las células aisladas como células madre no hematopoyéticas.

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

En ciertas realizaciones, las células madre placentarias para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son células aisladas que son CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺, y una o más, o todas, de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, y ABC-p⁺, en donde dichas

células aisladas se obtienen por disrupción física y/o enzimática de tejido placentario o tejido de cordón umbilical. En una realización específica, dichas células aisladas son adicionalmente OCT-4⁺ y ABC-p⁺. En otra realización específica, dichas células aisladas son también OCT-4⁺, en donde dichas células aisladas tienen al menos una de las siguientes características: CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra realización específica, dichas células aisladas son OCT-4⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra realización, dichas células aisladas son OCT-4⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En una realización más específica, dichas células aisladas son OCT-4⁺ y SH2⁺ o SH3⁺. En una realización más específica, dichas células aisladas son OCT-4⁺, SH2⁺, y SH3⁺. En otra realización más específica, dichas células aisladas son OCT-4⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻, y son SH2⁺ o SH3⁺. En otra realización más específica, dichas células aisladas son OCT-4⁺ y SH2⁺ o SH3⁺, y al menos una de CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻, o SSEA4⁻. En otra realización más específica, dichas células aisladas son OCT-4⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻, y SH2⁺ o SH3⁺.

En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺ para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son opcionalmente células SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En una realización más específica, dichas células aisladas son opcionalmente CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, CD45⁻, SSEA3⁻, o SSEA4⁻. En otra realización, dichas células aisladas son opcionalmente SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻. En una realización más específica, dichas células aisladas son opcionalmente SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, OCT-4⁺, o CD45⁻.

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

En ciertas realizaciones, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺ útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son opcionalmente HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células son adicionalmente CD73⁺. En otra realización específica, dichas células son adicionalmente CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células son adicionalmente CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células son CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺. En otra realización específica, dichas células aisladas facilitan la formación de cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende las células en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra realización específica, las células madre placentarias se aíslan de células placentarias o células del cordón umbilical que no son células madre o multipotentes. En otra realización específica, las células madre placentarias se aíslan de células madre placentarias que no muestran los marcadores descritos anteriormente.

Una población celular útil en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria es una población aislada de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida con, células madre placentarias CD200⁺, HLA-G⁺. Dicha población es una población de células placentarias. Dicha población es una población de células del cordón umbilical. Por ejemplo, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60% de las células de dicha población celular son células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas. En algunos ejemplos, al menos aproximadamente 70% de las células de dicha población son células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas. En otros ejemplos, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, o 99% de dichas células son células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas. En otro ejemplo de las poblaciones celulares, dichas células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas son también CD73⁺ y CD105⁺. En otro ejemplo, dichas células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro ejemplo, dichas células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otro ejemplo, dicha población celular produce uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otro ejemplo, las células CD200⁺, HLA-G⁺ producen uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otro ejemplo, dicha población celular se aísla de células que no son células madre. En otro ejemplo, dichas células CD200⁺, HLA-G⁺ aisladas se aíslan de células placentarias o células del cordón umbilical que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células madre placentarias para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son células CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, y CD200⁺ aisladas. En otra realización específica, las células son también HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células son también CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células son también CD38⁻ y CD45⁻. En una realización más específica, dichas células son también CD38⁻, CD45⁻, y HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, y CD200⁺ aisladas facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias o células de cordón umbilical que comprende las células madre placentarias, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra realización específica, dichas células placentarias aisladas se aíslan de células placentarias o células del cordón umbilical que no muestran estos marcadores.

En otra realización, una población celular útil en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria es una población aislada de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida con células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺. En una realización específica, dicha población es una población de células

placentarias. En otra realización específica, dicha población es una población de células de cordón umbilical. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60% de células de dicha población son dichas células CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺. En otra realización, al menos aproximadamente 70% de dichas células en dicha población celular son células CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99% de las células de dicha población celular son células CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ aisladas. En una realización específica de dicha población celular, las células aisladas son HLA-G⁺. En otra realización específica, las células aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, las células aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En una realización más específica, las células aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻; y HLA-G⁺. En otra realización específica, dicha población celular produce uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra realización específica, dicha población celular se aísla de células que no son células madre. En otra realización específica, dichas células CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ aisladas se aíslan de células placentarias o células del cordón umbilical que no muestran estos marcadores.

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

En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺ para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son también células OCT-4⁺. En una realización específica, dichas células son también CD73⁺. En otra realización específica, dichas células son también HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células OCT-4⁺ aisladas son también CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células OCT-4⁺ aisladas son CD38⁻ y CD45⁻. En una realización más específica, dichas células OCT-4⁺ son CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, y HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células OCT-4⁺ aisladas facilitan la producción de uno o más cuerpos de tipo embrioide por una población de células placentarias o células del cordón umbilical que comprende células madre placentarias, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra realización específica, dichas células OCT-4⁺ aisladas se aíslan de las células placentarias que no son células madre o células multipotentes. En otra realización específica, dichas células OCT-4⁺ aisladas se aíslan de células placentarias que no muestran estos marcadores.

Una población celular útil en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria es una población aislada de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida con células madre placentarias CD200⁺, OCT-4⁺. En algunos ejemplos, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60% de las células en dicha población celular son las células CD200⁺, OCT-4⁺. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 70% de dichas células son las células CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, o 99% de las células de dicha población son dichas células CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas. En un ejemplo de las poblaciones aisladas, dichas células CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD73⁺ y CD105⁺. En otro ejemplo, dichas células CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente HLA-G⁺. En otro ejemplo, dichas células CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En un ejemplo más específico, dichas células CD200⁺, OCT-4⁺ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otro ejemplo específico, la población de células produce uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD64⁻, CD200⁺, CD105⁺ para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son también células CD73⁺ y HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias son adicionalmente CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias son adicionalmente CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias son adicionalmente OCT-4⁺. En una realización más específica, dichas células madre placentarias son adicionalmente CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias facilitan la formación de cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende dichas células, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se aíslan de células placentarias que no son las células placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ aisladas. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se aíslan de células placentarias que no muestran estos marcadores.

Una población celular útil en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria es una población aislada de células que comprende, por ejemplo que está enriquecida en, células madre placentarias CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺ aisladas. En algunos ejemplos, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60% de las células en dicha población de células son células CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son células CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ aisladas. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son células CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ aisladas. En un ejemplo de las poblaciones anteriores, dichas células CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro ejemplo, dichas células CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro ejemplo dichas células CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ aisladas son adicionalmente OCT-4⁺. En otro ejemplo, dichas células CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ aisladas son adicionalmente CD200⁺. En otro ejemplo, dichas células CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺.

En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺ para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son opcionalmente CD73⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células aisladas que comprende dichas células CD73⁺, CD105⁺ cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En otra realización específica, dichas células son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células son adicionalmente OCT-4⁺. En una realización más específica, dichas células son adicionalmente OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células se aíslan de células placentarias o células del cordón umbilical que no muestran estas características.

Una población celular útil en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, por ejemplo que está enriquecida en, células madre placentarias aisladas que son CD73⁺, CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias o células de cordón umbilical aisladas que comprende dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. Por ejemplo, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60% de las células en dicha población de células son dichas células CD73⁺, CD105⁺ aisladas. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son dichas células CD73⁺, CD105⁺ aisladas. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son dichas células placentarias CD73⁺, CD105⁺ aisladas. En otro ejemplo de las poblaciones anteriores, dichas células CD73⁺, CD105⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro ejemplo, dichas células CD73⁺, CD105⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro ejemplo, dichas células CD73⁺, CD105⁺ aisladas son adicionalmente OCT-4⁺. En otro ejemplo, dichas células CD73⁺, CD105⁺ aisladas son adicionalmente CD200⁺. En otro ejemplo, dichas células CD73⁺, CD105⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otro ejemplo, dicha población celular se aísla de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺ para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son adicionalmente OCT-4⁺ que facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias aisladas que comprende dichas células cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En una realización específica, las células madre placentarias OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD73⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD38⁻, o CD45⁻. En una realización más específica, dichas células madre placentarias OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD73⁺, CD200⁺, CD38⁻, y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre placentarias OCT-4⁺ aisladas se aíslan de células placentarias que no son células placentarias OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células madre placentarias OCT-4⁺ aisladas se aíslan de células placentarias que no muestran estas características.

Una población celular útil en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, por ejemplo que está enriquecida en, células madre placentarias que son OCT-4⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias o células del cordón umbilical aisladas que comprende dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embriode. En algún ejemplo, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60% de las células en dicha población celular son dichas células OCT-4⁺ aisladas. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población celular son dichas células OCT-4⁺ aisladas. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99% de las células en dicha población celular son dichas células OCT-4⁺ aisladas. En un ejemplo específico de las poblaciones anteriores, dichas células OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro ejemplo, dichas células OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro ejemplo, dichas células OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD73⁺ y CD105⁺. En otro ejemplo, dichas células OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD200⁺. En otro ejemplo, dichas células OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, y

CD45⁻. En otro ejemplo, dicha población celular se aísla de células placentarias o células de cordón umbilical que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺ para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son adicionalmente HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻. En otro ejemplo, una población celular útil para los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria es una población aislada de células que comprende células madre placentarias, en donde al menos 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de las células en dicha población aislada de células son células madre placentarias HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ y CD34⁻ aisladas. En otro ejemplo, dicha célula aislada o población de células aisladas se aísla de las células que no son células HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ y CD34⁻. En otro ejemplo, dichas células placentarias aisladas son de origen no materno. En otro ejemplo, dicha población aislada de células está sustancialmente libre de componentes maternos; por ejemplo, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 99% de dichas células en dicha población aislada de células son de origen no materno.

En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺ para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son adicionalmente CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻. En un ejemplo, una población celular útil para los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria es una población de células que comprende células madre placentarias, en donde al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de las células en dicha población de células son células madre placentarias CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻ aisladas. En un ejemplo, dichas células aisladas o población aislada de células se aísla de las células que no son dichas células. En otro ejemplo, dichas células CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻ aisladas son de origen no materno, es decir, tienen el genotipo fetal. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 99% de dichas células en dicha población aislada de células son de origen no materno. En otro ejemplo, dichas células aisladas o población aislada de células placentarias se aíslan de las células que no muestran estas características.

En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺ para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son adicionalmente células CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, y CD117⁻. En un ejemplo, una población celular útil para los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, por ejemplo enriquecida en, células placentarias aisladas, en donde al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de las células en dicha población de células son células madre placentarias CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, y CD117⁻ aisladas. En un ejemplo, dicha célula aislada o población aislada de células se aísla de las células que no son dichas células. En otro ejemplo, dichas células aisladas son de origen no materno. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 99% de dichas células en dicha población celular son de origen no materno. En otro ejemplo, dicha célula aislada o población aislada de células placentarias se aísla de las células que no muestran estos marcadores.

En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺ para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son adicionalmente células CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻. En un ejemplo, una población celular útil para los métodos de tratamiento descritos en la presente invención es una población aislada de células que comprende, por ejemplo enriquecida en, células madre placentarias CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻ aisladas, en donde al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% ó al menos aproximadamente 99% de las células en dicha población son dichas células CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻. En una realización específica, dichas células aisladas o población aislada de células se aíslan de las células que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células aisladas son de origen no materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 99% de dichas células en dicha población celular son de origen no materno. En otra realización específica, dichas células aisladas o población aislada de células se aísla de las células que no muestran estas características.

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

realización específica, dichas células aisladas o población aislada de células se aíslan de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

5 En otra realización, las células madre placentarias para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son células aisladas que son CD105⁺, CD34⁻, CD200⁺ y CD10⁺, según lo determinado por unión de anticuerpos, y CD117⁻, según lo determinado por unión de anticuerpos y RT-PCR. En otra realización, las células madre placentarias útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son células aisladas, por ejemplo células madre o células multipotentes, que son CD105⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD54⁺, CD200⁺, HLA-G⁺, HLA de clase I⁺ y β -2-microglobulina⁺.

10 En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺ útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son células placentarias o células del cordón umbilical aisladas, por ejemplo, células madre placentarias, células multipotentes placentarias, células madre del cordón umbilical o células multipotentes del cordón umbilical, que son adicionalmente una o más de CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD106/VCAM⁺, CD144/cadherina-VE^{baja}, CD184/CXCR4⁻, β 2-microglobulina^{baja}, MHC-I^{baja}, MHC-II⁻, HLA-G^{baja}, y/o PDL1^{baja}. En una realización específica, dichas células aisladas son al menos CD29⁺ y CD54⁺. En otra realización específica, dichas células aisladas son al menos CD44⁺ y CD106⁺. En otra realización específica, dichas células aisladas son al menos CD29⁺.

20 En otra realización, una población celular útil en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria comprende células madre placentarias aisladas, y al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ó 99% de las células en dicha población celular son células madre placentarias aisladas que son CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺, y adicionalmente una o más de CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD106/VCAM⁺, CD144/cadherina-VE^{baja}, CD184/CXCR4⁻, β -microglobulina^{baja}, HLA-I^{baja}, HLA-II⁻, HLA-G^{baja}, y/o PDL1^{baja}. En una realización más específica, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ó 99% de las células madre placentarias en dicha población celular son CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, CD105⁺, y adicionalmente CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD106/VCAM⁺, CD144/cadherina-VE^{baja}, CD184/CXCR4⁻, β 2-microglobulina^{baja}, MHC-I^{baja}, MHC-II⁻, HLA-G^{baja}, y PDL1^{baja}.

30 En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, y CD105⁺ útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son células placentarias o células del cordón umbilical aisladas (por ejemplo, células madre o células multipotentes) que son adicionalmente una o más, o la totalidad, de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, y ABC-p⁺, en donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de la placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a la mitoxantrona (MXR)), en donde dichas células madre placentarias se obtienen por perfusión de una placenta de mamífero, por ejemplo humana, que ha sido drenada de sangre del cordón umbilical y perfundida para separar la sangre residual.

35 En otra realización, las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD200⁺, y CD105⁺ útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son células placentarias o células del cordón umbilical aisladas en donde la expresión de al menos un marcador celular en dichas células es al menos dos veces mayor que para una célula madre mesenquimal (por ejemplo, una célula madre mesenquimal derivada de la médula ósea) o fibroblasto dérmico. En otra realización específica, dichas células aisladas son de origen no materno (es decir, tienen el genotipo fetal). En otra realización específica, dicho tejido está contenido en una población celular en donde al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 99% de las células en dicha población celular son células madre placentarias que son de origen no materno.

45 El perfil genético confirma que las células madre placentarias aisladas, y las poblaciones aisladas de células madre placentarias, son distinguibles de otras células, por ejemplo, fibroblastos dérmicos o células madre mesenquimales, por ejemplo células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, sobre la base de la expresión de ciertos genes. Las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria pueden distinguirse de, por ejemplo, fibroblastos dérmicos o células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea sobre la base de la expresión de uno o más genes, cuya expresión es significativamente mayor (por ejemplo, estadísticamente significativamente mayor, o dos veces más alta) en las células madre placentarias en comparación con los fibroblastos dérmicos o las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. En particular, las células madre placentarias se pueden distinguir de las células madre mesenquimales sobre la base de la expresión de uno o más genes, cuya expresión es significativamente mayor (es decir, al menos dos veces más alta) en las células madre placentarias que en un equivalente número de fibroblastos dérmicos o células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, en donde el uno o más genes son ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, ILIA, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A, o una combinación de cualesquiera de los anteriores, cuando las células se cultivan en condiciones equivalentes. Ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2007/0275362. En una realización más específica, dichas células madre placentarias expresan dicho uno o más genes (de manera diferencial en comparación con los fibroblastos dérmicos o las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea) cuando se cultivan desde aproximadamente 3 a aproximadamente 35 duplicaciones de población en un medio

que comprende DMEM-LG (por ejemplo, de Gibco); suero bovino fetal al 2% (por ejemplo, de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona 10^{-9} M (por ejemplo, de Sigma); ácido ascórbico-2-fosfato 10^{-4} M (por ejemplo, de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/mL (por ejemplo, de R&D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/mL (por ejemplo, de R&D Systems). En una realización específica, el gen específico de la célula madre placentaria es CD200.

Las secuencias específicas para estos genes se pueden encontrar en GenBank en los números de acceso. NM_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), (NM_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM_001845 (COL4A1), NM_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758 (DMD), AF293359 (DSC3), NM_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM_018215 (FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (ILIA), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NM_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM_014476 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160 or BC065328 (SLC12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN), y BC005001 (ZC3H12A) a partir de marzo de 2008.

En una realización más específica, dichas células madre placentarias expresan cada uno de ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, ILIA, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, y ZC3H12A a un nivel detectable más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, cuando las células se cultivan en condiciones equivalentes.

La expresión de los genes mencionados anteriormente puede evaluarse mediante técnicas estándar. Por ejemplo, mediante técnicas convencionales se pueden seleccionar y construir individualmente sondas basadas en la secuencia del(de los) gen(es). La expresión de los genes se puede evaluar, por ejemplo, en una micromatriz que comprende sondas a uno o más de los genes, por ejemplo una micromatriz Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133A 2.0, o una Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133 Plus 2.0 (Santa Clara, California). La expresión de estos genes se puede evaluar incluso si la secuencia para un número de acceso GenBank particular se modifica debido a que las sondas específicas para la secuencia modificada se pueden generar fácilmente usando técnicas estándar bien conocidas.

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

Se puede usar el nivel de expresión de estos genes para seleccionar poblaciones de células placentarias aisladas. Por ejemplo, una población de células, por ejemplo células expandidas por clonación, puede seleccionarse si la expresión de uno o más de los genes enumerados anteriormente es significativamente mayor en una muestra de la población de células que en una población equivalente de células madre mesenquimales. Dicha selección puede ser de una población a partir de una pluralidad de poblaciones de células placentarias aisladas, a partir de una pluralidad de poblaciones celulares cuya identidad no se conoce, etc.

Se pueden seleccionar células placentarias aisladas, por ejemplo células madre placentarias sobre la base del nivel de expresión de uno o más de tales genes en comparación con el nivel de expresión de dicho uno o más genes en, por ejemplo un control de células madre mesenquimales, por ejemplo el nivel de expresión de dicho uno o más genes en un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. 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 células placentarias aisladas ensayadas en ciertas condiciones, es un valor numérico que representa el nivel de expresión de dicho uno o más genes en células madre mesenquimales en dichas condiciones.

Las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria muestran las características anteriores (por ejemplo, combinaciones de marcadores de superficie celular y/o perfiles de expresión génica) en cultivo primario, o durante la proliferación en un medio que comprende, por ejemplo, DMEM-LG (Gibco), suero bovino fetal al 2% (FCS) (Hyclone Laboratories), 1x insulina-transferrina-selenio (ITS), 1x ácido linoléico-albúmina de suero bovino (LA-BSA), dexametasona 10^{-9} M (Sigma), ácido ascórbico-2-fosfato 10^{-4} M (Sigma), factor de crecimiento

epidérmico (EGF) 10ng/ml (R&D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10ng/ml (R&D Systems), y 100U de penicilina /1000U de estreptomycin.

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

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

15 En otra realización, células madre placentarias útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son células placentarias o células del cordón umbilical aisladas, en donde una pluralidad de las células son positivas para la aldehído deshidrogenasa (ALDH), según se evalúa mediante un ensayo de la actividad aldehído deshidrogenasa. Tales ensayos se conocen en la técnica (ver, por ejemplo Bostian y Betts, *Biochem. J.*, 173, 787, (1978)). En una realización específica, dicho ensayo de ALDH usa ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregon) como marcador de la actividad aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, dicha pluralidad está entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 25% de las células en dicha población de células. En otra realización, dichas células madre placentarias muestran una actividad ALDH al menos tres veces mayor, o al menos cinco veces mayor que una población de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea que tiene aproximadamente el mismo número de células y cultivadas en las mismas condiciones.

20 En ciertas realizaciones de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden células madre placentarias, como se describe en la presente memoria, las células madre placentarias en dichas poblaciones de células están sustancialmente libres de células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 99% de las, por ejemplo, células madre placentarias en dichas poblaciones tienen un genotipo fetal. En algunas otras realizaciones de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias descritas en la presente memoria, las poblaciones de células que comprenden dichas células madre placentarias están sustancialmente libres de células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 99% de las células (por ejemplo células madre placentarias) en dicha población tienen un genotipo fetal.

25 En una realización específica de cualquiera de las anteriores células madre placentarias aisladas, por ejemplo, o poblaciones de células aisladas que comprenden, por ejemplo, las células madre placentarias, el cariotipo de, por ejemplo, las células madre placentarias, o al menos aproximadamente 95% o aproximadamente 99% de las células en dicha población, es normal. En otra realización específica de cualquiera de las anteriores células madre placentarias o poblaciones celulares, las células madre placentarias, o, por ejemplo, las células madre placentarias en la población de células, son de origen no materno.

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

35 Se pueden obtener células madre placentarias aisladas útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria, por ejemplo mediante interrupción de tejido placentario o tejido del cordón umbilical, con o sin digestión enzimática (ver Sección 5.5.3), o por perfusión (ver Section 5.5.4). Por ejemplo, se pueden producir poblaciones de células madre placentarias aisladas de acuerdo con un método que comprende perfundir una placenta de mamífero que se ha drenado de sangre de cordón umbilical y se ha perfundido para separar 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 placentarias aisladas; y aislar una pluralidad de dichas células placentarias aisladas de dicha población de células.

En una realización específica, la disolución de perfusión se pasa a través de la vena umbilical y arterias umbilicales y se recoge después de que exude 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.

- 5 En diversas realizaciones, las células madre placentarias aisladas, contenidas en una población de células obtenidas por perfusión de una placenta, son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ó al menos 99,5% de dicha población de células placentarias. En otra realización específica, las células madre placentarias aisladas recogidas por perfusión comprenden células fetales y maternas. En otra realización específica, las células placentarias aisladas recogidas por perfusión son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ó al menos
10 99,5% de células fetales.

En la presente memoria se describe también una composición que comprende una población de las células placentarias aisladas, por ejemplo células madre placentarias, como se describe en la presente memoria, recogidas por perfusión, en donde dicha composición comprende al menos una parte de la disolución de perfusión usada para recoger las células placentarias aisladas.

- 15 En ciertas realizaciones, poblaciones aisladas de las células madre placentarias descritas en la presente memoria se pueden producir mediante digestión de tejido placentario o tejido del cordón umbilical con una enzima disruptiva de tejidos para obtener una población de células que comprende las células madre placentarias, y aislando, o aislando sustancialmente, una pluralidad de las células madre placentarias del resto de dichas células placentarias o de
20 cordón umbilical. La totalidad, o cualquier parte de la placenta o cordón umbilical se puede digerir para obtener las células madre placentarias descritas en la presente memoria. En realizaciones específicas, por ejemplo, dicho tejido puede ser una placenta completa, una membrana amniótica, corion, una combinación de amnios y corion, cordón umbilical, o una combinación de cualesquiera de los anteriores. En otra realización específica, la enzima disruptiva del tejido es tripsina, colagenasa, dispasa o similares. En diversas realizaciones, las células madre placentarias aisladas, contenidas dentro de una población de células obtenidas de la digestión de una placenta, son al menos
25 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ó al menos 99,5% de dicha población de células placentarias.

- Las poblaciones aisladas de células madre placentarias, o poblaciones aisladas de células que comprenden células madre placentarias, descritas anteriormente, pueden comprender aproximadamente, al menos, o no más de, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ó más de las
30 células placentarias aisladas. Las poblaciones de células placentarias aisladas útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria comprenden al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, ó 99% de células placentarias aisladas viables, según se determina mediante, por ejemplo, exclusión de azul tripano.

4.2.3 Crecimiento en cultivo

- 35 El crecimiento de las células placentarias, por ejemplo células madre placentarias, descritas en la presente memoria, como para cualquier célula de mamífero, depende en parte del medio particular seleccionado para el crecimiento. En condiciones óptimas, las células madre placentarias generalmente duplican su número en 1-5 días. Durante el cultivo, las células madre placentarias proporcionadas en esta invención se adhieren a un sustrato en el cultivo, por ejemplo la superficie de un recipiente de cultivo tisular (por ejemplo, plástico para placas de cultivo tisular, plástico revestido con fibronectina, y similares) y forman una monocapa.

- 40 Las poblaciones de células placentarias aisladas que comprenden las células placentarias, por ejemplo células madre placentarias, cuando se cultivan en condiciones apropiadas, pueden formar cuerpos de tipo embriode, es decir, grupos tridimensionales de células crecen sobre la capa de células madre placentarias adherente. Las células dentro de los cuerpos de tipo embriode expresan marcadores asociados con células madre muy tempranas, por ejemplo, OCT-4, Nanog, SSEA3 y SSEA4. Las células dentro de los cuerpos de tipo embriode no son normalmente
45 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 cuerpos de tipo embriode son dependientes de la viabilidad de las células madre placentarias, ya que los cuerpos de tipo embriode no se forman en ausencia de las células placentarias, por ejemplo células madre placentarias. Las células madre placentarias adherentes facilitan así el crecimiento de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células
50 placentarias que comprenden las células madre placentarias. Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que las células de los cuerpos de tipo embriode crecen en las células madre placentarias adherentes tanto como crecen las células madre embrionarias en una capa alimentadora de células. Las células madre mesenquimales, por ejemplo las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, no desarrollan cuerpos de tipo embriode en el cultivo.

- 55 4.3 Métodos para obtener células madre placentarias

4.3.1 Composición de recogida de células madre

Las células madre placentarias se pueden recoger y aislar según los métodos descritos en la presente memoria. Generalmente, las células madre se obtienen de una placenta de mamífero o cordón umbilical usando una

disolución fisiológicamente aceptable, por ejemplo una composición de recogida de células madre. Una composición de recogida de células madre se describe con detalle en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2007/0190042.

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

10 La composición de recogida de células madre puede comprender uno o más componentes que tienden a preservar las células madre placentarias, es decir, evitar que las células madre placentarias se mueran, o retrasar la muerte de las células madre placentarias, reducir el número de células madre placentarias en una población de células que mueren, o similares, desde el momento de la recogida hasta el momento del cultivo. Tales componentes pueden ser, por ejemplo, un inhibidor de la apoptosis (por ejemplo, un inhibidor de caspasas o inhibidor de JNK); un vasodilatador (por ejemplo, sulfato magnésico, un fármaco antihipertensivo, péptido natriurético atrial (ANP), adrenocorticotropina, hormona liberadora de corticotropina, nitroprusiato sódico, hidralazina, adenosin-trifosfato, adenosina, indometacina o sulfato magnésico, un inhibidor de fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de la necrosis (por ejemplo, 2-(1H-Indol-3-il)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina, o clonazepam); un inhibidor de TNF- α ; y/o un perfluorocarbono portador de oxígeno (por ejemplo, bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

20 La composición de recogida de células madre puede comprender una o más enzimas que degradan el tejido, por ejemplo una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una RNasa, o una DNasa, o similares. Tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, colagenasas (por ejemplo, colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASE™, hialuronidasa, y similares.

25 La composición de recogida de células madre puede comprender una cantidad bactericida o bacteriostáticamente eficaz de un antibiótico. En ciertas realizaciones no limitantes, el antibiótico es un macrólido (por ejemplo, tobramicina), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxilo), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (por ejemplo, penicilina V) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En una realización particular, el antibiótico es activo contra las bacterias Gram(+) y/o Gram(-), por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y similares.

30 La composición de recogida de células madre puede comprender también uno o más de los compuestos siguientes: 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 de peso molecular superior a 20.000 Daltons, en una realización, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad endotelial y la viabilidad celular (por ejemplo, un coloide sintético o natural, un polisacárido tal como dextrano o un poli(etilenglicol) presente en aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (por ejemplo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presente en aproximadamente 25 μ M a aproximadamente 100 μ M); un agente reductor (por ejemplo, N-acetilcisteína presente en aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que evita la entrada de calcio en las células (por ejemplo, verapamilo presente en aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 25 μ M); nitroglicerina (por ejemplo, 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 (por ejemplo, heparina o hirudina presente en una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (por ejemplo, amilorida, etil-isopropil-amilorida, hexametilen-amilorida, dimetil-amilorida o isobutil-amilorida presente en aproximadamente 1,0 μ M a aproximadamente 5 μ M).

4.3.2 Recogida y manejo de placenta y cordón umbilical

50 Generalmente, una placenta humana, con cordón umbilical, se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento. En una realización preferida, la placenta se recupera de un paciente después del consentimiento informado y después de que se toma un historial médico completo del paciente y se asocia con la placenta. Preferiblemente, el historial médico continúa después del parto. Tal historial médico puede usarse para coordinar el uso posterior de la placenta/cordón umbilical o las células madre extraídas de ellos. Por ejemplo, se pueden usar células placentarias, por ejemplo células madre placentarias, a la luz de la historia clínica, para la medicina personalizada para el bebé asociada con la placenta y el cordón umbilical, o para los padres, hermanos u otros parientes del bebé.

55 Antes de la recuperación de las células madre placentarias, se separa la sangre del cordón umbilical y de la placenta. En ciertas realizaciones, después del parto, se recupera la sangre del cordón umbilical y de la placenta. La placenta puede someterse a un procedimiento convencional de recuperación de sangre del cordón umbilical. Típicamente se usa una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para desangrar la placenta (ver, por ejemplo, Anderson, patente de EE.UU. U.S. No. 5.372.581; Hessel *et al.*, patente de EE.UU. No. 5.415.665). La aguja o

cánula generalmente se coloca en la vena umbilical y la placenta se puede masajear suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón umbilical desde la placenta. Dicha recuperación de sangre del cordón umbilical se puede realizar comercialmente, por ejemplo, LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell. En ciertas realizaciones, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional para minimizar la disrupción tisular durante la recuperación de la sangre del cordón umbilical.

Normalmente, una placenta se transporta desde la sala de parto o nacimiento a otra ubicación, por ejemplo un laboratorio, para la recuperación de sangre del cordón umbilical y recogida de células madre mediante, por ejemplo, perfusión o disociación tisular. La placenta se transporta preferiblemente en un dispositivo de transporte estéril, térmicamente aislado (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28°C), por ejemplo colocando la placenta, con cordón umbilical proximal sujetado, en una bolsa plástica estéril con cierre hermético, que después se coloca en un recipiente aislado. En otra realización, la placenta se transporta en un estuche de recogida de sangre del cordón umbilical, sustancialmente como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. pendiente No. 2006/0060494, presentada el 19 de septiembre de 2005, o en la patente de EE.UU. No. 7.147.626. Preferiblemente, la placenta se entrega en el laboratorio en cuatro a veinticuatro horas después del parto. En ciertas realizaciones, el cordón umbilical proximal se sujeta, preferiblemente dentro de los 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de la sangre del cordón umbilical. En algunas otras realizaciones, el cordón umbilical se sujeta de forma distal, por ejemplo en o cerca del extremo del cordón umbilical, lejos de la placenta. En otras realizaciones, el cordón umbilical se sujeta después de la recuperación de la sangre del cordón umbilical, pero antes del procesamiento adicional de la placenta.

La placenta y cordón umbilical, antes de la recogida de células madre, se pueden almacenar en condiciones estériles y a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25°C (centígrados). La placenta y cordón umbilical se pueden almacenar durante un periodo de más de cuarenta y ocho horas, y preferiblemente durante un periodo de cuatro a veinticuatro horas antes de perfundir la placenta para separar cualquier sangre residual del cordón umbilical. La placenta y cordón umbilical se almacenan preferiblemente en una disolución anticoagulante a una temperatura de 5 a 25°C (centígrados). Se conocen bien en la técnica disoluciones anticoagulantes adecuadas. Por ejemplo, se puede usar una disolución de heparina o warfarina sódica. En una realización preferida, la disolución anticoagulante comprende una disolución de heparina (por ejemplo, 1% peso/peso en disolución 1:1000). La placenta y cordón umbilical desangrados se almacenan preferiblemente durante no más de 36 horas antes de que se recojan las células, por ejemplo células madre placentarias.

La placenta de mamíferos o una parte de la misma, o cordón umbilical, una vez recogida y preparada en general como anteriormente, se puede tratar de cualquier manera conocida en la técnica, por ejemplo se puede perfundir o romper, por ejemplo digerirse con una o más enzimas disruptivas de tejidos, para obtener células madre.

4.3.3 Disrupción física y digestión enzimática de tejido

En una realización se recogen células madre de una placenta de mamífero o cordón umbilical mediante disrupción física, por ejemplo digestión enzimática, usando por ejemplo la composición de recogida de células madre descrita en la sección 4.3.1 anterior. Por ejemplo, la placenta, o una porción de la misma, o el cordón umbilical se pueden, por ejemplo, machacar, cortar, picar, cortar en trozos, rajar, macerar o similares, mientras están en contacto con, por ejemplo tampón, medio o composición de recogida de células madre, y el tejido ser posteriormente digerido con una o más enzimas. La placenta, o una porción de la misma, o el cordón umbilical también pueden romperse físicamente y digerirse con una o más enzimas, y sumergir después el material resultante o mezclarse en un tampón, medio o una composición de recogida de células madre. Se puede usar cualquier método de disrupción física, siempre que el método de disrupción deje una pluralidad, más preferiblemente una mayoría, y más preferiblemente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, ó 99% de las células en dicho órgano viable, según se determina mediante, por ejemplo, exclusión de azul tripano.

La placenta o el cordón umbilical se pueden diseccionar en componentes antes de la disrupción física y/o digestión enzimática y la recuperación de células madre. Por ejemplo, se pueden obtener células madre placentarias a partir de la membrana amniótica, el corion, los cotiledones placentarios, o cualquier combinación de los mismos, o a partir de una porción de un cordón umbilical. En una realización, se obtienen células madre placentarias a partir de tejido placentario que comprende amnios y corion, amnios-corion, o cordón umbilical. Normalmente, se obtienen células madre placentarias mediante disrupción de un pequeño bloque de tejido placentario o tejido de cordón umbilical, por ejemplo, un bloque de tejido placentario o tejido de cordón umbilical que es aproximadamente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó aproximadamente 1000 milímetros cúbicos de volumen.

Una composición preferida de recogida de células madre comprende una o más enzima(s) disruptivas de tejidos. La digestión enzimática usa preferiblemente una combinación de enzimas, por ejemplo una combinación de tripsina, colagenasa, y/o dispasa, incluyendo opcionalmente hialuronidasa, o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.) y hialuronidasa. Otras enzimas que se pueden usar para romper el tejido placentario incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina, o elastasa. Se pueden inhibir serina proteasas mediante alfa-2-microglobulina en suero y por tanto el medio usado para la digestión está normalmente libre de suero. Se usan comúnmente EDTA y DNasa en procedimientos de digestión

enzimática para aumentar la eficacia de la recuperación celular. El digerido se diluye preferiblemente para evitar que se atrapen células madre dentro de la digestión viscosa.

Se puede usar cualquier combinación de enzimas de digestión tisular. Las concentraciones típicas para las enzimas de digestión tisular incluyen, por ejemplo, 50-200 U/mL para colagenasa I y colagenasa IV, 1-10 U/mL para dispasa, y 10-100 U/mL para elastasa. Se pueden usar proteasas en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o se pueden usar secuencialmente para liberar células madre placentarias. Por ejemplo, en una realización, una placenta o parte de la misma, o cordón umbilical se digiere primero con una cantidad apropiada de colagenasa I en 2 mg/ml durante 30 minutos, seguida por digestión con tripsina, al 0,25%, durante 10 minutos a 37°C. Se usan preferiblemente serina proteasas consecutivamente después del uso de otras enzimas.

En otra realización, el tejido puede romperse adicionalmente mediante la adición de un quelante, por ejemplo ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil-eter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la composición de recogida de células madre que comprende las células madre, o a una disolución en la que el tejido se rompe y/o se digiere antes del aislamiento de las células madre con la composición de recogida de células madre.

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

4.3.4 Perfusión placentaria

Las células madre placentarias también se pueden obtener por perfusión de una placenta de mamífero. Los métodos para perfundir placentas de mamíferos para obtener células madre se describen, por ejemplo, en Hariri, patentes de EE.UU. U.S. Nos. 7.045.148 y 7.468.276, y en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2007/0190042.

Se pueden recoger células madre placentarias por perfusión, por ejemplo a través de la vasculatura placentaria, usando por ejemplo una composición de recogida de células madre como una disolución de perfusión. En una realización, una placenta de mamífero se perfunde mediante el paso de disolución de perfusión a través de la arteria umbilical y vena umbilical o a través de una de ellas. El flujo de la disolución de perfusión a través de la placenta se puede lograr usando, por ejemplo, el flujo por gravedad hacia la placenta. Preferiblemente, la disolución de perfusión es forzada a través de la placenta usando una bomba, por ejemplo una bomba peristáltica. La vena umbilical se puede canalizar, por ejemplo, con una cánula, por ejemplo una cánula de plástico o TEFLON® que se conecta a un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión. En ciertas realizaciones, los vasos del cordón umbilical están canalizados proximales a la placenta, por ejemplo dentro de aproximadamente 2-3 centímetros de la placenta; en otras realizaciones, los vasos del cordón umbilical están canalizados distales a la placenta, por ejemplo dentro de aproximadamente 2-3 centímetros del extremo del cordón umbilical más alejado de la placenta.

En la preparación para la perfusión, la placenta está preferiblemente orientada (por ejemplo, suspendida) de tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical están ubicadas en el punto más alto de la placenta. La placenta se puede perfundir mediante el paso de un fluido de perfusión, por ejemplo la composición de recogida de células madre proporcionada en la presente invención, a través de la vasculatura placentaria, o a través de la vasculatura placentaria y tejido circundante. En una realización, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un depósito de la disolución de perfusión. La disolución de perfusión se pasa a la vena y la arteria umbilical. La disolución de perfusión exuda y/o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un vaso abierto adecuado de la superficie de la placenta que se unió al útero de la madre durante la gestación. La disolución de perfusión también puede introducirse a través de la abertura del cordón umbilical y permitir que fluya o percole fuera de las aberturas en la pared de la placenta que se interconecta con la pared uterina materna. 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.

En una realización, el cordón umbilical proximal se sujeta durante la perfusión, y más preferiblemente, se sujeta dentro de los 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 glóbulos rojos residuales de la sangre de cordón umbilical y/o sangre placentaria. El fluido de perfusión se vuelve más incoloro a medida que avanza la perfusión y las células sanguíneas residuales del cordón umbilical se eliminan de la placenta. En general, son adecuados 30 a 100 ml (mililitros) de fluido de perfusión para desangrar inicialmente la placenta, pero se puede usar más o menos fluido de perfusión dependiendo de los resultados observados.

El volumen de líquido de perfusión usado para recoger células madre placentarias puede variar, dependiendo del número de células madre a recoger, el tamaño de la placenta, el número de recogidas a realizar de una sola placenta, etc. En diversas realizaciones, el volumen de 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, ó 750 mL a 2000 mL. Normalmente, la placenta se perfunde con 700-800 mL de líquido de perfusión después del desangrado.

La placenta se puede perfundir varias veces en el transcurso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se ha de perfundir varias veces, se puede mantener o cultivar en condiciones asépticas en un recipiente u otro recipiente adecuado, y perfundirse con la composición de recogida de células madre, o una disolución de perfusión estándar (por ejemplo, una disolución salina normal tal como disolución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (por ejemplo, heparina, warfarina sódica, cumarina, bishidroxicumarina), y/o con o sin un agente antimicrobiano (por ejemplo, β -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomycin (por ejemplo, a 40-100 μ g/ml), penicilina (por ejemplo, a 40 U/ml), anfotericina B (por ejemplo, at 0,5 μ g/ml). En una realización, una placenta aislada se mantiene o se cultiva durante un periodo de tiempo sin recoger el perfundido, 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, ó 24 horas, ó 2 ó 3 ó más días antes de la perfusión y recogida del perfundido. La placenta perfundida se puede mantener durante uno o más tiempo(s) adicional(es), por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó más horas, y perfundirse por segunda vez con, por ejemplo, 700-800 mL de fluido de perfusión. La placenta se puede perfundir 1, 2, 3, 4, 5 ó más veces, por ejemplo una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 horas. En una realización preferida, la perfusión de la placenta y recogida de la disolución de perfusión, por ejemplo composición de recogida de células madre, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos en diferentes puntos de tiempo pueden adicionalmente procesarse individualmente para recuperar poblaciones de células dependientes del tiempo, por ejemplo células madre. También se pueden agrupar perfundidos de diferentes puntos de tiempo.

Sin desear estar limitados por teoría alguna, después del desangrado y un tiempo suficiente de perfusión de la placenta, se cree que las células madre migran hacia la microcirculación desangrada y perfundida de la placenta y cordón umbilical donde se recogen, preferiblemente mediante lavado en un vaso colector por perfusión. Perfundir la placenta aislada no solo sirve para separar sangre residual del cordón umbilical, sino que también proporciona a la placenta los nutrientes apropiados, incluido el oxígeno. La placenta se puede cultivar y perfundir con una disolución similar que se usó para separar las células sanguíneas residuales del cordón umbilical, preferiblemente sin la adición de agentes anticoagulantes.

La perfusión como se describe en la presente memoria da como resultado la recogida de significativamente más células madre que el número que se pueden obtener de una placenta de mamífero no perfundida con dicha disolución, y que no se trata de otro modo para obtener células madre (por ejemplo, mediante disrupción tisular, por ejemplo digestión enzimática). En este contexto, "significativamente más" significa al menos 10% más. La perfusión produce significativamente más células madre que, por ejemplo, el número de células madre que se obtienen de 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 disruptivas de tejidos. En una realización específica, una placenta o parte de la misma (por ejemplo, membrana amniótica, amnios y corion, lóbulo placentario o cotiledón, o combinación de cualesquiera de los anteriores) se lleva a 25-37°C, y se incuba con una o más enzimas disruptivas de tejidos en 200 mL de un medio de cultivo durante 30 minutos. Se recogen las células del perfundido, se llevan a 4°C, y se lavan con una mezcla fría de inhibidores que comprende EDTA 5 mM, ditioneitol 2 mM y beta-mercaptoetanol 2 mM. Las células madre se lavan después de varios minutos con una composición fría (por ejemplo, 4°C) de recogida de células madre descrita en otra parte en la presente memoria.

Se apreciará que la perfusión usando el método pan, es decir, mediante el cual el perfundido se recoge después de que ha exudado del lado materno de la placenta, da como resultado una mezcla de células fetales y maternas. Como resultado, las células recogidas mediante este método comprenden una población mixta de células madre placentarias de origen tanto fetal como materno. En cambio, la perfusión únicamente a través de la vasculatura placentaria, mediante la cual el fluido de perfusión se pasa a través de uno o dos vasos placentarios y se recoge únicamente a través del(de los) vaso(s) restante(s), da como resultado la recogida de una población de células madre placentarias casi exclusivamente de origen fetal.

4.3.5 Aislamiento, clasificación, y caracterización de células madre placentarias

Las células madre de placenta o cordón umbilical de mamíferos, ya sean obtenidas por perfusión o digestión enzimática, se pueden purificar inicialmente de (es decir, aisladas de) otras células mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Dicha centrifugación puede seguir cualquier protocolo estándar para la velocidad de centrifugación, etc. En una realización, por ejemplo, las células recogidas de la placenta o cordón umbilical se recuperan del perfundido mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, que separa las células de, por ejemplo, residuos contaminantes y plaquetas. En otra realización, el perfundido placentario se concentra a aproximadamente 200 ml, se coloca suavemente en capas sobre Ficoll, y se centrifuga a

aproximadamente 1100 x g durante 20 minutos a 22°C, y la capa celular de interfase de baja densidad se recoge para su posterior procesamiento.

5 Se pueden resuspender glóbulos celulares en una composición de nueva aportación de recogida de células madre, o en un medio adecuado para el mantenimiento de células madre, por ejemplo medio sin suero IMDM que contiene 2U/ml de heparina y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY). La fracción de células mononucleares totales se puede aislar, por ejemplo usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.

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

15 Las células madre placentarias obtenidas por perfusión o digestión se pueden, por ejemplo, aislar adicional o inicialmente por tripsinización diferencial usando, por ejemplo, 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 y las células madres de cordón umbilical generalmente se desprenden de las superficies plásticas en aproximadamente cinco minutos, mientras que otras poblaciones adherentes normalmente requieren más de 20-30 minutos de incubación. Las células desprendidas pueden recogerse después de la tripsinización y la neutralización de la tripsina, usando por ejemplo Disolución Neutralizante de Tripsina (TNS, Cambrex). En una realización de aislamiento de células adherentes, se colocan partes alícuotas de, por ejemplo, aproximadamente 5-10 x 10⁶ células en cada uno de varios
20 matraces T-75, preferiblemente matraces T75 revestidos con fibronectina. En tal realización, las células pueden cultivarse con medio de crecimiento de células madre mesenquimales disponible comercialmente (MSCGM) (Cambrex), y colocarse en una incubadora de cultivo tisular (37°C, CO₂ al 5%). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se separan de los matraces mediante lavado con PBS. Después el PBS se reemplaza por MSCGM.
25 Los matraces se examinan preferiblemente a diario para detectar la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y expansión de grupos de células fibroblastoides.

30 El número y tipo de células recogidas de una placenta de mamífero se puede monitorizar, por ejemplo midiendo cambios en la morfología y marcadores de la superficie celular usando técnicas de detección celular estándar tales como citometría de flujo, clasificación celular, inmunocitoquímica (por ejemplo, tinción con anticuerpos específicos de tejidos o específicos de marcadores celulares) clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), mediante examen de la morfología de las células usando microscopía óptica o confocal, y/o midiendo cambios en la expresión génica usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como PCR y perfiles de expresión génica. Estas técnicas se pueden usar también para identificar células que son positivas para uno o más marcadores en particular. Por ejemplo, usando anticuerpos contra CD34,
35 se puede determinar, usando las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; si es así, la célula es CD34⁺. Del mismo modo, si una célula produce RNA de OCT-4 suficiente para ser detectable por RT-PCR, o significativamente más RNA de OCT-4 que una célula adulta, la célula es OCT-4⁺. Anticuerpos para marcadores de superficie celular (por ejemplo, marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de genes específicos de células madre, tales como OCT-4, son bien conocidos en la técnica.

40 Las células madre placentarias, por ejemplo las células que se han aislado mediante separación de Ficoll, adherencia diferencial, o una combinación de ambas, pueden clasificarse usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluidas las células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165). La excitación con láser de restos fluorescentes en las
45 partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos o ligandos específicos de marcadores de superficie celular están marcados con distintos marcadores fluorescentes. Las células se procesan a través del clasificador de células, lo que permite la separación de células basada en su capacidad para unirse a los anticuerpos usados. Las partículas clasificadas por FACS pueden depositarse directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o 384 pocillos para facilitar la separación y clonación.
50

En un esquema de clasificación, las células madre de placenta o del cordón umbilical se clasifican sobre la base de la expresión de los marcadores CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, y/o HLA-G; es decir, la ausencia de CD34, CD38 y CD45, y la presencia de CD44, CD73, CD105 y/o HLA-G. Esto se puede lograr en relación con los procedimientos para seleccionar células madre sobre la base de sus propiedades de adherencia en cultivo. Por
55 ejemplo, una célula madre de selección por adherencia se puede lograr antes o después de la clasificación sobre la base de la expresión del marcador. En una realización, por ejemplo, las células se clasifican primero sobre la base de su expresión de CD34; las células CD34⁺ se retienen, y las células que son, por ejemplo, CD200⁺HLA-G⁺ se separan de todas las demás células CD34⁺. En otra realización, las células de la placenta se basan en su expresión de marcadores CD200 y/o HLA-G; por ejemplo, las células que muestran cualquiera de estos marcadores se aíslan para su uso posterior. Las células que expresan, por ejemplo, CD200 y/o HLA-G pueden, en una realización
60 específica, ser adicionalmente clasificadas sobre la base de su expresión de CD73 y/o CD105, o epítomos

reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o falta de expresión de CD34, CD38 ó CD45. Por ejemplo, en una realización, las células placentarias y/o células de cordón umbilical se clasifican por la expresión, o falta de la misma, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y las células que son CD200⁺, HLA-G⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻ se aíslan de otras células para su uso posterior.

- 5 En otra realización, se pueden usar perlas magnéticas para separar células. Las células se pueden clasificar usando una técnica de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), un método para separar partículas en función de su capacidad para unirse a perlas magnéticas (0,5-100 µm de diámetro). Se puede realizar una variedad de modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluida la adición covalente de anticuerpo que reconoce específicamente una particular molécula de la superficie celular o hapteno. Las perlas se mezclan después con las células para permitir la unión. Después las células se pasan a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de superficie celular específico. En una realización, estas células se pueden aislar después y volver a mezclar con perlas magnéticas copuladas con un anticuerpo contra marcadores de superficie celular adicionales. Las células se pasan nuevamente a través de un campo magnético, aislando a las células que se unen a ambos anticuerpos. Dichas células se pueden diluir después en placas separadas, como placas de microtitulación para aislamiento clonal.

- 15 Las células madre placentarias se pueden caracterizar y/o clasificar también en función de la morfología celular y características de crecimiento. Por ejemplo, las células madre placentarias se pueden caracterizar por tener, y/o seleccionarse sobre la base de, por ejemplo, un aspecto de fibroblastoide en cultivo. Las células madre placentarias se pueden caracterizar también por tener, y/o seleccionarse en función de, su capacidad para formar cuerpos de tipo embrioide. En una realización, por ejemplo, las células placentarias o células de cordón umbilical que son de forma fibroblastoide, expresan CD73 y CD105, y producen uno o más cuerpos de tipo fibroblastoide en cultivo, se aíslan de otras células placentarias o células del cordón umbilical. En otra realización, las células placentarias OCT-4⁺ que producen uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo se aíslan de otras células placentarias.

- 20 Se puede evaluar la viabilidad, potencial de proliferación, y longevidad de las células madre placentarias usando métodos estándar conocidos en la técnica, tales como el ensayo de exclusión de azul tripano, ensayo de absorción de diacetato de fluoresceína, ensayo de absorción de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y ensayo de absorción de timidina, ensayo de proliferación celular MTT (para evaluar la proliferación). La longevidad se puede determinar mediante métodos bien conocidos en la técnica, tal como mediante la determinación del número máximo de duplicaciones de la población en un cultivo extendido.

- 25 Las células madre placentarias también pueden separarse de otras células usando otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo el crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación y descongelación; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación a contracorriente); separación por gravedad unitaria; distribución a contracorriente; electroforesis, y similares.

4.4 Cultivo de células madre placentarias

4.4.1 Medios de cultivo

- 30 Se pueden usar células madre placentarias aisladas, o poblaciones de células madre placentarias, o tejido placentario o tejido del cordón umbilical a partir de los cuales crecen las células madre, para iniciar o sembrar cultivos celulares. Las células generalmente se transfieren a recipientes de cultivo tisular estériles, no revestidos o revestidos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado) gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de membrana extracelular (por ejemplo MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

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

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

El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferiblemente aproximadamente al 2-15% (v/v); suero equino (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-1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, que incluyen L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo penicilina G, sulfato de estreptomycin, anfotericina B, gentamicina, y nistatina, ya sea solos o en combinación.

4.4.2 Expansión y proliferación de células madre placentarias

Una vez que una célula madre placentaria, o población aislada de células madre (por ejemplo, una célula madre o población de células madre separadas de al menos el 50% de las células placentarias con las que la célula madre o población de células madre está normalmente asociada *in vivo*) está aislada, la célula madre o población de células madre pueden proliferar y expandirse *in vitro*. Por ejemplo, una población de células madre placentarias se puede cultivar en recipientes de cultivo tisular, por ejemplo platos, matraces, placas multipocillo, o similares, durante un tiempo suficiente para que las células madre proliferen hasta una confluencia de 70-90%, es decir, hasta que las células madre y su progeñie ocupen 70-90% del área de superficie de cultivo del recipiente de cultivo tisular.

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

Una vez que se obtiene 70%-90% de confluencia, las células se pueden pasar. Por ejemplo, las células se pueden tratar enzimáticamente, por ejemplo tripsinizarse, usando métodos bien conocidos en la técnica, para separarlas de la superficie de cultivo tisular. Después de separar las células pipeteando y contando las células, aproximadamente 10.000-100.000 células madre por centímetro cuadrado, preferiblemente aproximadamente 50.000 células madre por centímetro cuadrado, se pasan a un nuevo recipiente de cultivo que contiene medio de cultivo de nueva aportación. Normalmente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del que las células madre se separaron. En la presente invención se proporcionan poblaciones de células madre placentarias que se han pasado al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, ó 20 veces, o más, y combinaciones de las mismas.

4.4.3 Poblaciones de células madre placentarias

La presente invención proporciona células madre placentarias o poblaciones de las mismas, en donde las células son CD10+, CD34-, CD200+, y CD105+, para usar en los métodos de tratamiento proporcionados en la presente memoria. Las poblaciones de células madre placentarias se pueden aislar directamente de una o más placentas; es decir, la población de células madre placentarias puede ser una población de células placentarias o células del cordón umbilical, que comprenden células madre placentarias o células del cordón umbilical, obtenidas de, o contenidas en el perfundido, u obtenidas de, o contenidas en, el digerido (es decir, la recolección de células obtenidas por digestión enzimática de una placenta o parte de la misma, o de un cordón umbilical). Las células madre placentarias aisladas también se pueden cultivar y expandir para producir poblaciones de células madre placentarias. Las poblaciones de células placentarias o células del cordón umbilical que comprenden células madre placentarias se pueden cultivar también y expandir para producir poblaciones de células madre placentarias.

En diversas realizaciones, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ó 99% de las células en una población de células placentarias aisladas o población de células del cordón umbilical son células madre placentarias. Es decir, una población de células placentarias o población de células del cordón umbilical que comprende células madre placentarias puede comprender, por ejemplo, tanto como 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de células no madre.

En la presente memoria se proporcionan métodos para producir poblaciones de células madre placentarias aisladas mediante, por ejemplo, selección de células madre placentarias o células madre del cordón umbilical, ya sean derivadas de digestión enzimática o perfusión, que expresan marcadores particulares y/o características morfológicas o de cultivo particulares. En una realización, por ejemplo, se puede producir una población celular mediante un método que comprende seleccionar células placentarias o del cordón umbilical que (a) se adhieren a un sustrato plástico de cultivo tisular, (b) son CD10+, CD34-, CD200+ y CD105+; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otro ejemplo, una población celular puede producirse mediante un método que

comprende seleccionar células placentarias o del cordón umbilical 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 celular. En otra realización, el método para producir una población celular comprende seleccionar células placentarias o células del cordón umbilical 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 celular. En otra realización, el método para producir una población celular comprende seleccionar células placentarias o células del cordón umbilical 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 celular. En otra realización, el método para producir una población celular comprende seleccionar células placentarias o células del cordón umbilical que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embriode; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otra realización, el método para producir una población celular comprende seleccionar células placentarias o células del cordón umbilical 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 celular. En otra realización, el método para producir una población celular 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 de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embriode; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En cualquiera de las anteriores realizaciones, el método puede comprender adicionalmente seleccionar células placentarias o células del cordón umbilical que expresan ABC-p (una proteína transportadora ABC específica de la placenta; ver, por ejemplo, Allikmets *et al.*, *Cancer Res.* 58(23):5337-9 (1998)).

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

Las células, por ejemplo células madre placentarias, se pueden seleccionar para una población de células madre placentarias mediante cualquier medio conocido en la técnica de selección celular. Por ejemplo, las células se pueden seleccionar usando un anticuerpo o anticuerpos para uno o más marcadores de la superficie celular, por ejemplo en citometría de flujo o FACS. La selección se puede lograr usando anticuerpos junto con perlas magnéticas. Se conocen en la técnica anticuerpos que son específicos para ciertos marcadores relacionados con células madre. Por ejemplo, anticuerpos para OCT-4 (Abcam, Cambridge, MA), CD200 (Abcam), HLA-G (Abcam), CD73 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), CD105 (Abcam; BioDesign International, Saco, ME), *etc.* Anticuerpos contra otros marcadores están también disponibles comercialmente, por ejemplo CD34, CD38 y CD45 están disponibles en, por ejemplo, StemCell Technologies o BioDesign International.

Las poblaciones de células madre placentarias aisladas se pueden combinar con una o más poblaciones de células no madre o células no placentarias. Por ejemplo, una población aislada de células madre placentarias se puede combinar con sangre (por ejemplo, sangre placentaria o sangre del cordón umbilical), células madre derivadas de la sangre (por ejemplo, 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 en su estado natural, células madre adultas (somáticas), poblaciones de células madre contenidas dentro del tejido, células madre cultivadas, poblaciones de células completamente diferenciadas (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células musculares, células cardíacas, etc.) y similares. Las células en una población de células placentarias aisladas se pueden combinar con 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, 5.000:1, 2.000:1, 1.000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:5.000; 1:10.000; 1:20.000; 1:50.000; 1:100.000; 1:500.000; 1:1.000.000; 1:2.000.000; 1:5.000.000; 1:10.000.000; 1:20.000.000; 1:50.000.000; o aproximadamente 1:100.000.000, comparando números de células nucleadas totales de cada población. Las células en una población de células placentarias aisladas se pueden combinar también con células de una pluralidad de tipos celulares.

En una realización, una población aislada de células madre placentarias se combina con células madre hematopoyéticas. Dichas células madre hematopoyéticas pueden estar contenidas, por ejemplo, dentro de la placenta no procesada, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en las células nucleadas totales de sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en una población aislada de células CD34⁺ de la sangre, por ejemplo sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en médula ósea sin procesar; en las células nucleadas totales de la médula ósea; en una población aislada de células CD34⁺ de la médula ósea, o similares.

4.5 Conservación de células madre placentarias

Las células placentarias, por ejemplo las células madre placentarias, pueden conservarse, es decir, colocarse en condiciones que permiten el almacenamiento a largo plazo, o condiciones que inhiben la muerte celular por, por ejemplo, apoptosis o necrosis.

Las células pueden conservarse usando, por ejemplo, una composición que comprende un inhibidor de la apoptosis, un inhibidor de la necrosis y/o un perfluorocarbono que lleva oxígeno, como se describe en la solicitud de patente publicada en EE.UU. 2007/0190042. En una realización, una población de células madre placentarias se conserva poniendo en contacto la población con una composición de recogida de células madre que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono que lleva 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 células madre, en comparación con una población de células madre sin 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 las células madre placentarias. En otra realización, dicha composición de recogida de células madre comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono que lleva oxígeno en fases separadas. En otra realización, dicha composición de recogida de células madre comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono que lleva oxígeno en una emulsión. En otra realización, la composición de recogida de células madre comprende adicionalmente un emulsionante, por ejemplo lecitina. En otra realización, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 25°C en el momento de ponerse en contacto con las células madre. En otra realización más específica, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 2°C y 10°C, o entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 5°C, en el momento de ponerse en contacto con las células madre. En otra realización más específica, dicho contacto se realiza durante el transporte de dicha población de células madre. En otra realización más específica, dicho contacto se realiza durante la congelación y descongelación de la población de células madre placentarias.

En otra realización, las poblaciones de células madre placentarias pueden conservarse mediante un método que comprende poner en contacto la población 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 células, por ejemplo células madre placentarias, en comparación con una población de células que no entraron en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, el compuesto conservante de órganos es una disolución UW (descrita en la patente de EE.UU. No. 4.798.824; también conocida como ViaSpan; ver también Southard *et al.*, *Transplantation* 49(2):251-257 (1990)) o una disolución descrita en Stern *et al.*, patente de EE.UU. No. 5.552.267. En otra realización, dicho compuesto conservante de órganos es hidroxietil-almidón, ácido lactobiónico, rafinosa, o una combinación de los mismos. En otra realización, la composición de recogida de células madre comprende adicionalmente un perfluorocarbono que lleva oxígeno, ya sea en dos fases o como una emulsión.

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

Normalmente, durante la recogida, enriquecimiento y aislamiento, de células placentarias o del cordón umbilical, es preferible minimizar o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y estrés mecánico. Por tanto, en otra realización del método, las células madre placentarias se exponen a una condición hipóxica durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, en donde una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración de oxígeno en sangre normal. En una realización más específica, las células madre placentarias se exponen a dicha condición hipóxica durante menos de dos horas durante dicha conservación. En otra realización más específica, las células madre placentarias se exponen a dicha condición hipóxica durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no se exponen a una condición hipóxica, durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento. En otra realización específica, las células madre placentarias no se exponen a estrés de corte durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento.

Las células madre placentarias descritas en la presente memoria se pueden crioconservar, por ejemplo en medio de crioconservación en pequeños recipientes, por ejemplo ampollas. El medio de crioconservación adecuado incluye, pero no se limita a, medio de cultivo que incluye, por ejemplo, medio de crecimiento, o medio de congelación celular, por ejemplo medio de congelación celular disponible comercialmente, medios denominados C2695, C2639 ó C6039 (Sigma). El medio de crioconservación comprende preferiblemente DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración de, por ejemplo aproximadamente 10% (v/v). El medio de crioconservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo Plasmalyte, metilcelulosa y/o glicerol. Las células madre placentarias se enfrían preferiblemente a aproximadamente 1°C/min durante la crioconservación. Una temperatura de crioconservación preferida es aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, preferiblemente aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C. Las células crioconservadas se pueden transferir a nitrógeno líquido antes de descongelar para su uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células crioconservadas se descongelan preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37°C.

4.6 Composiciones que comprenden células madre placentarias

La presente invención, por ejemplo, usa composiciones que comprenden células madre placentarias. En la presente memoria se proporcionan ejemplos representativos, no limitativos, de tales composiciones.

4.6.1.1 Células criopreservadas

5 Células placentarias, por ejemplo células madre placentarias, y poblaciones de células madre placentarias, por ejemplo criopreservadas para su uso posterior. Los métodos para la criopreservación de células, tales como células madre, se conocen bien en la técnica. Se pueden preparar poblaciones de células madre placentarias de forma que sean fácilmente administrables a un individuo. Por ejemplo, las células madre placentarias pueden estar contenidas dentro de un recipiente que sea adecuado para uso médico. Dicho recipiente puede ser, por ejemplo, una bolsa de plástico estéril, un matraz, un frasco u otro recipiente desde el cual se pueda dispensar fácilmente la población de células madre placentarias. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico médicamente aceptable adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El recipiente es preferiblemente uno que permite la criopreservación de la población celular combinada.

15 Las poblaciones de células madre placentarias criopreservadas pueden comprender células placentarias o células del cordón umbilical derivadas de un solo donante, o de múltiples donantes. La población de células madre placentarias puede ser completamente HLA compatible para un receptor deseado, o parcial o completamente HLA incompatible.

20 Por tanto, en una realización, en la presente invención se proporciona una composición que comprende la población de células madre placentarias para usar en la invención en un recipiente. En una realización específica, la población celular está criopreservada. En otra realización específica, el recipiente es una bolsa, un matraz o un frasco. En una realización más específica, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. En una realización más específica, dicha bolsa es adecuada para, permite o facilita, la administración intravenosa de dicha población celular placentaria. La bolsa puede comprender múltiples lúmenes o compartimentos que están interconectados para permitir la mezcla de las células madre placentarias y una u otras más disoluciones, por ejemplo 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 celular. En otra realización específica, dicha población celular placentaria 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 celular placentaria comprende células madre placentarias que son HLA compatibles para un receptor de dicha población celular. En otra realización específica, dicha población celular comprende células madre placentarias que son al menos parcialmente HLA incompatibles para un receptor. En otra realización específica, dichas células madre placentarias se derivan de una pluralidad de donantes.

4.6.1.2 Composiciones farmacéuticas

35 Las poblaciones de células madre placentarias aisladas, o poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias aisladas para usar en un método de tratamiento como se describe en la presente memoria, se pueden formular en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones farmacéuticas comprenden una población de células madre placentarias aisladas, o una población de células que comprende células madre placentarias aisladas, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo una disolución salina u otra disolución aceptada farmacéuticamente aceptable para administración *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria pueden comprender cualquiera, o cualquier combinación, de las poblaciones de células madre placentarias aisladas, o células madre placentarias aisladas, descritas en otra parte en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células aisladas fetales, maternas, o tanto fetales como maternas. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente invención pueden comprender además células madre placentarias aisladas obtenidas del cordón umbilical o placenta de un solo individuo, o de cordones umbilicales o placentas de una pluralidad de individuos. Cualquiera de las células madre placentarias, descritas en otra parte en la presente memoria, se puede formular en una composición farmacéutica, como se describe a continuación.

50 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente invención pueden comprender cualquier número de células madre placentarias aisladas. Por ejemplo, una sola dosis unitaria de células madre placentarias aisladas puede comprender, en diversas 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} ó más células aisladas.

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

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente invención pueden comprender uno o más compuestos que, por ejemplo facilitan el injerto (anticuerpos anti-receptores de células T, un inmunosupresor, o similares); estabilizadores tales como albúmina, dextrano 40, gelatina, hidroxietil-almidón, plasmalito, y similares.

5 Cuando se formula como una disolución inyectable, en una realización, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 1% a 1,5% de HSA y aproximadamente 2,5% de dextrano. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 5×10^6 células por mililitro a aproximadamente 2×10^7 células por mililitro en una disolución que comprende HSA al 5% y dextrano al 10%, que opcionalmente comprende un inmunosupresor, por ejemplo ciclosporina A a, por ejemplo, 10 mg/kg.

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

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

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

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

10⁶ células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución es a no más de aproximadamente 7,5 x 10⁶ células por mililitro. En algunas otras realizaciones, si la disolución que contiene células filtradas, antes de la dilución, comprende menos de aproximadamente 15 x 10⁶ células por mililitro, la filtración es opcional. En algunas otras realizaciones, si la disolución que contiene células filtradas, antes de la dilución, comprende menos de aproximadamente 10 ± 3 x 10⁶ células por mililitro, la filtración es opcional. En algunas otras realizaciones, si la disolución que contiene células filtradas, antes de la dilución, comprende menos de aproximadamente 7,5 x 10⁶ células por mililitro, la filtración es opcional.

En una realización específica, las células se crioconservan entre dicha dilución con una primera disolución de dilución y dicha dilución con dicha segunda disolución de dilución. En otra realización específica, la primera disolución de dilución comprende dextrano y HSA. El dextrano en la primera disolución de dilución o segunda disolución de dilución puede ser dextrano de cualquier peso molecular, por ejemplo dextrano que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 150 kDa. En algunas realizaciones, dicho dextrano en dicha primera disolución de dilución o dicha segunda disolución es aproximadamente dextrano al 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% ó 10%. En otra realización específica, el dextrano en dicha primera disolución de dilución o dicha segunda disolución de dilución es dextrano-40. En otra realización específica, el dextrano en dicha primera disolución de dilución y dicha segunda disolución de dilución es dextrano-40. En otra realización específica, dicho dextrano-40 en dicha primera disolución de dilución es dextrano-40 al 5,0%. En otra realización específica, dicho dextrano-40 en dicha primera disolución de dilución es dextrano-40 al 5,5%. En otra realización específica, dicho dextrano-40 en dicha segunda disolución de dilución es dextrano-40 al 10%. En otra realización específica, dicha HSA en dicha disolución que comprende HSA es HSA al 1 a 15 %. En otra realización específica, dicha HSA en dicha disolución que comprende HSA es HSA aproximadamente al 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% ó 15 %. En otra realización específica, dicha HSA en dicha disolución que comprende HSA es HSA al 10%. En otra realización específica, dicha primera disolución de dilución comprende HSA. En una realización más específica, dicha HSA en dicha primera disolución de dilución es HSA al 10%. En otra realización específica, dicha primera disolución de dilución comprende un crioprotector. En una realización más específica, dicho crioprotector es DMSO. En otra realización específica, dicho dextrano-40 en dicha segunda disolución de dilución es dextrano-40 aproximadamente al 10%. En otra realización específica, dicha composición que comprende células comprende dextrano aproximadamente al 7,5% a aproximadamente al 9%. En otra realización específica, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 1,0 ± 0,3 x 10⁶ células por mililitro a aproximadamente 5,0 ± 1,5 x 10⁶ células por mililitro. En otra realización específica, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 1,5 x 10⁶ células por mililitro a aproximadamente 3,75 x 10⁶ células por mililitro.

En otra realización, la composición farmacéutica se prepara mediante un método que comprende (a) filtrar una disolución que contiene células que comprende células madre placentarias antes de la crioconservación para producir una disolución que contiene células filtradas; (b) crioconservar las células en la disolución que contiene células filtradas a aproximadamente 1 a 50 x 10⁶, 1 a 40 x 10⁶, 1 a 30 x 10⁶, 1 a 20 x 10⁶, 1 a 15 x 10⁶, ó 1 a 10 x 10⁶ células por mililitro; (c) descongelar las células; y (d) diluir la disolución que contiene células filtradas de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:11 (v/v) con una disolución de dextrano-40. En ciertas realizaciones, si el número de células es inferior a aproximadamente 10 ± 3 x 10⁶ células por mililitro antes de la etapa (a), la filtración es opcional. En una realización más específica, las células en la etapa (b) se crioconservan a aproximadamente 10 ± 3 x 10⁶ células por mililitro. En una realización más específica, las células en la etapa (b) se crioconservan en una disolución que comprende aproximadamente 5% a aproximadamente 10% de dextrano-40 y HSA. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (b) es a no más de aproximadamente 15 x 10⁶ células por mililitro.

En otra realización, la composición farmacéutica se prepara mediante un método que comprende: (a) suspender células madre placentarias en una disolución de dextrano-40 al 5,5% que comprende HSA al 10% para formar una disolución que contiene células; (b) filtrar la disolución que contiene células a través de un filtro de 70 µM; (c) diluir la disolución que contiene células con una disolución que comprende dextrano-40 al 5,5%, HSA al 10%, y DMSO al 5% a aproximadamente 1 a 50 x 10⁶, 1 a 40 x 10⁶, 1 a 30 x 10⁶, 1 a 20 x 10⁶, 1 a 15 x 10⁶, ó 1 a 10 x 10⁶ células por mililitro; (d) crioconservar las células; (e) descongelar las células; y (f) diluir la disolución que contiene células 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano-40 al 10%. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (c) es a no más de aproximadamente 15 x 10⁶ células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (c) es a no más de aproximadamente 10 ± 3 x 10⁶ células/mL. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (c) es a no más de aproximadamente 7,5 x 10⁶ células/mL.

En otra realización, la composición que comprende células se prepara mediante un método que comprende: (a) centrifugar una pluralidad de células, por ejemplo células madre placentarias, para recoger las células; (b) resuspender las células en dextrano-40 al 5,5%; (c) centrifugar las células para recoger las células; (d) resuspender las células en una disolución de dextrano-40 al 5,5% que comprende HSA al 10%; (e) filtrar las células a través de un filtro de 70 µM; (f) diluir las células en dextrano-40 al 5,5%, HSA al 10%, y DMSO al 5% a aproximadamente 1 a 50 x 10⁶, 1 a 40 x 10⁶, 1 a 30 x 10⁶, 1 a 20 x 10⁶, 1 a 15 x 10⁶, ó 1 a 10 x 10⁶ células por mililitro; (g) crioconservar las células; (h) descongelar las células; y (i) diluir las células 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano-40 al 10%. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) es a no más de aproximadamente 15 x 10⁶ células por mililitro. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) es a no más de aproximadamente 10 ± 3 x 10⁶ células/mL. En ciertas realizaciones, dicha dilución en la etapa (f) es a no más de aproximadamente 7,5 x 10⁶ células/mL. En algunas otras

realizaciones, si el número de células es inferior a aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro, la filtración es opcional.

5 Las composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas que comprenden las células placentarias aisladas, descritas en la presente memoria pueden comprender cualquiera de las células madre placentarias aisladas descritas en la presente memoria.

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

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

10 En una realización específica, la composición farmacéutica comprende adicionalmente una célula madre que no se obtiene de una placenta.

15 Las células madre placentarias aisladas en las composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas, proporcionadas en la presente invención, pueden comprender células madre placentarias derivadas de un solo donante, o de múltiples donantes. Las células placentarias aisladas pueden ser completamente HLA compatibles para un receptor deseado, o parcial o completamente HLA incompatibles.

4.6.1.3 Medios condicionados por células madre placentarias

20 Las células madre placentarias para usar en la invención se pueden usar para producir medio condicionado. En diversas realizaciones, el medio condicionado comprende medio en el que las células madre placentarias han crecido durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó más días. En otras realizaciones, el medio condicionado comprende medio en el que las células madre placentarias han crecido hasta al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de confluencia, o hasta el 100% de confluencia. En otra realización, el medio condicionado comprende un medio en el que se han cultivado células madre placentarias y no placentarias, células madre no del cordón umbilical.

4.6.2 Banco de células placentarias

25 Las células, por ejemplo células madre placentarias, de placentas y/o cordones umbilicales posparto, se pueden cultivar en una serie de maneras diferentes para producir un conjunto de lotes, por ejemplo un conjunto de dosis administrables individualmente, de células madre placentarias. Tales lotes pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de células madre de perfundido placentario o perfundido del cordón umbilical, o de tejido placentario o tejido del cordón umbilical digerido por enzimas. Los conjuntos de lotes de células madre placentarias, obtenidas de una o una pluralidad de placentas, se pueden organizar en un banco de células para, por ejemplo, el almacenamiento a largo plazo. Generalmente, las células madre adherentes se obtienen a partir de un cultivo inicial de material placentario o del cordón umbilical para formar un cultivo de siembra, por ejemplo de células madre placentarias, que se expande en condiciones controladas para formar poblaciones de células a partir de números aproximadamente equivalentes de duplicaciones. Los lotes se derivan preferiblemente del tejido de una sola placenta o cordón umbilical, pero pueden derivarse del tejido de una pluralidad de placentas.

35 En una realización, los lotes de células madre se obtienen como sigue. El tejido se rompe primero, por ejemplo mediante picado, se digiere con una enzima adecuada, por ejemplo colagenasa (ver sección 5.2.3, más arriba). El tejido comprende preferiblemente, por ejemplo todo el amnios, el corion entero, ambos, o un cordón umbilical de una sola placenta, pero puede comprender solamente una parte del amnios, corion o cordón umbilical. El cultivo digerido se cultiva, por ejemplo, durante aproximadamente 1-3 semanas, preferiblemente aproximadamente 2 semanas. Después de la separación de las células no adherentes, las colonias de alta densidad que se forman se recogen, por ejemplo mediante tripsinización. Estas células se recogen y resuspenden en un volumen conveniente de medio de cultivo, y se definen como células del paso 0.

45 Las células del paso 0 se utilizan después para sembrar cultivos de expansión. Los cultivos de expansión pueden ser cualquier disposición de aparatos de cultivo celular separados, por ejemplo una Fábrica Celular por NUNC™. Las células en el cultivo del paso 0 se pueden subdividir en cualquier grado para sembrar cultivos de expansión con, por ejemplo, 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 , ó 10×10^4 células madre. Preferiblemente, se usan de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^4 células del paso 0 por centímetro cuadrado para sembrar cada cultivo de expansión. El número de cultivos de expansión puede depender del número de células del paso 0, y puede ser mayor o menor en número dependiendo de la(s) placenta(s) particular(es) de que se obtienen las células madre.

55 Los cultivos de expansión se dejan crecer hasta que la densidad de las células en cultivo alcanza un cierto valor, por ejemplo aproximadamente 1×10^5 células/cm². Las células se pueden recoger y criopreservar en este punto, o pasar a nuevos cultivos de expansión como se ha descrito anteriormente. Las células se pueden pasar, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 veces antes de su uso. Un registro del número

acumulado de duplicaciones de población se mantiene preferiblemente durante el(los) cultivo(s) de expansión. Las células de un cultivo de paso 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 ó 40 duplicaciones, o hasta 60 duplicaciones. Sin embargo, preferiblemente, el número de duplicaciones de población, antes de dividir la población de células en dosis individuales, es entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 duplicaciones. Las células pueden cultivarse continuamente a lo largo del proceso de expansión, o se pueden congelar en uno o más puntos durante la expansión.

Las células a usar para dosis individuales se pueden congelar, por ejemplo criopreservar para su uso posterior. Las dosis individuales pueden comprender, por ejemplo, aproximadamente 1 millón a aproximadamente 50 millones de células por ml, y pueden comprender entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^{10} células en total.

Por tanto, en una realización, se puede hacer un banco de células madre placentarias mediante un método que comprende: expandir células madre placentarias de cultivo primario de una placenta humana posparto o cordón umbilical para una primera pluralidad de duplicaciones de población; criopreservar dichas células madre placentarias para formar un Banco Celular Maestro; expandir una pluralidad de células madre placentarias del Banco Celular Maestro para una segunda pluralidad de duplicaciones de población; criopreservar las células madre placentarias para formar un Banco Celular de Trabajo; expandir una pluralidad de células madre placentarias del Banco Celular de Trabajo para una tercera pluralidad de duplicaciones de población; y criopreservar las células madre placentarias en dosis individuales, en donde dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células madre placentarias.

En otra realización específica, las células de cultivo primario comprenden células madre placentarias de perfundido placentario. En otra realización específica, dichas células de cultivo primario comprenden células madre placentarias de tejido placentario digerido. En otra realización específica, dichas células de cultivo primario comprenden células madre placentarias de perfundido placentario y de tejido placentario digerido. En otra realización específica, la totalidad de dichas células madre placentarias en dicho cultivo primario son de la misma placenta. En otra realización específica, el método comprende además la etapa de seleccionar células madre placentarias CD200⁺ de dicha pluralidad de células de dicho Banco Celular de Trabajo para formar dosis individuales. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^5 células madre placentarias. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 células madre placentarias. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 células madre placentarias. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 células madre placentarias. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^9 células madre placentarias. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden de aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} células madre placentarias.

En una realización preferida, el donante del que se obtiene la placenta (por ejemplo, la madre) se analiza para detectar al menos un patógeno. Si la madre da un resultado positivo para un patógeno probado, se descarta todo el lote de la placenta. Dichas pruebas pueden realizarse en cualquier momento durante la producción de lotes de células madre placentarias, incluso antes o después del establecimiento de células del paso 0, o durante el cultivo de expansión. Los agentes patógenos para los que se prueba la presencia pueden incluir, sin limitación, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, virus de inmunodeficiencia humana (tipos I y II), citomegalovirus, herpesvirus, y similares.

5. Ejemplos

5.1 Ejemplo 1: Tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones pulmonares usando células madre placentarias

Este ejemplo proporciona regímenes de tratamientos ejemplares para enfermedades, trastornos o afecciones pulmonares.

5.1.1 Tratamiento de lesión pulmonar aguda

Un individuo presenta una lesión pulmonar aguda debida a inhalación de humo. Al individuo se le administra 1×10^8 a 5×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁺CD105⁺CD200⁺ en una disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa. El individuo es monitorizado durante las dos semanas siguientes para evaluar la reducción en uno o más de los síntomas, incluido un aumento del volumen espiratorio forzado (FEV). El individuo es monitorizado durante el transcurso del próximo año, y células madre placentarias en la misma dosis se administran según sea necesario.

5.1.2 Tratamiento de un trastorno pulmonar intersticial

Un individuo se presenta con síntomas que incluyen dificultad respiratoria, tos no productiva, y evidencia de hemorragia en un pulmón. Se realiza un diagnóstico de enfermedad pulmonar intersticial. Al individuo se le administran 5×10^8 a 1×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁺CD105⁺CD200⁺ en una disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa. El individuo es monitorizado durante los próximos 100 días para observar una mejoría

detectable, según se determina por espirometría u otra medida del volumen espiratorio forzado (FEV). El individuo también se evalúa opcionalmente mediante una o más radiografías de tórax, tomografía computarizada o MRI (imágenes de resonancia magnética) para determinar si la hemorragia ha mejorado.

5.1.3 Profilaxis de un trastorno pulmonar asociado con la enfermedad de injerto contra el huésped

5 A un individuo que espera un trasplante alogénico de médula ósea se le administran 5×10^8 a 1×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa dentro de las 24 horas previas al trasplante de médula ósea. La administración de las células se repite en 24 horas después del trasplante de médula ósea. El individuo es monitorizado durante los próximos 100 días, y se le administra una dosis de seguimiento de $5-10 \times 10^8$ células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ si la GVHD se desarrolla y progresa más allá del Grado I.

5.1.4 Tratamiento de un trastorno pulmonar causado por la enfermedad de injerto contra el huésped

15 Un individuo que ha recibido un trasplante alogénico de médula ósea presenta bronquiolitis obliterante y enfermedad de injerto contra el huésped de grado III. Al individuo se le administran 5×10^8 a 1×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa dentro de las 24 horas de la presentación, y el individuo es monitorizado diariamente durante una semana por espirometría para determinar la mejoría en la respiración. Si la respiración no mejora sustancialmente dentro de los 4-7 días posteriores a la administración inicial, según se evalúa mediante al menos una mejoría del 10% en el volumen espiratorio forzado (FEV₁) o capacidad vital forzada (FVC), o una mejoría de la relación FEV₁/FVC hasta al menos el 80%, la administración de las células se repite. Al individuo se le administra opcionalmente uno o más de un esteroide inhalado, un esteroide oral, o azitromicina (por ejemplo, 250 mg una vez al día durante aproximadamente 3 meses después de la presentación) además de las células madre placentarias. El individuo es monitorizado durante los próximos 100 días, y se le administra una dosis de seguimiento de 5×10^8 a 1×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en cualquier momento si la GVHD de grado III o peor se repite, o si FEV₁ o la FVC disminuye en cualquier momento en el 10% o más, o si la relación FEV₁/FVC cae a <70%.

25 5.1.5 Tratamiento de un trastorno pulmonar causado por la enfermedad de injerto contra el huésped

Un individuo que ha recibido un trasplante de hígado presenta bronquiolitis obliterante y enfermedad de injerto contra el huésped de grado III. Al individuo se le administran 2×10^8 a 8×10^8 células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa (día 0); una segunda administración se le da 7 días después. El individuo es monitorizado diariamente entre las dosis, y durante 7 días después, mediante espirometría para determinar la mejoría en la respiración. Si la respiración no mejora sustancialmente en un lapso de 4-7 días después de la segunda administración, como se evalúa mediante al menos una mejoría del 10% en volumen espiratorio forzado (FEV₁) o capacidad vital forzada (FVC), o una mejoría de la relación FEV₁/FVC hasta al menos el 75%, o si la GVHD no disminuye a un grado II o inferior, la administración de las células se repite, y al individuo se le administra uno o más de un esteroide inhalado, un esteroide oral, o azitromicina (por ejemplo, 250 mg una vez al día durante aproximadamente 3 meses después de la presentación) además de las células madre placentarias. El individuo es monitorizado durante los próximos 100 días, y se le administra una dosis de seguimiento de 5×10^8 a 1×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en cualquier momento si la GVHD de grado III o peor reaparece, o si el FEV₁ o la FVC disminuyen en cualquier momento en el 10% o más, o si la relación FEV₁/FVC cae a <70%.

40 5.1.6 Tratamiento de trastornos pulmonares asociados con artritis reumatoide

Un individuo presenta artritis reumatoide con afectación pulmonar. Al individuo se le administran $1-5 \times 10^8$ células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa. El individuo recibe metotrexato en una dosis estándar y se monitoriza para la reducción de la inflamación pulmonar.

45 Un segundo individuo presenta artritis reumatoide con afectación pulmonar. La afectación pulmonar se debe en parte a la administración de metotrexato. La terapia con metotrexato se detiene, y al individuo se le administra una combinación de células madre placentarias no modificadas y células madre placentarias que se han modificado para producir un polipéptido de fusión que comprende IL-1Ra y DHFR, en donde los dos tipos de células madre se administran en una relación 1:1. Las células diseñadas y no diseñadas son $1-5 \times 10^8$ células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en disolución de NaCl al 0,9%. El individuo es monitorizado para la reducción de la inflamación pulmonar.

5.1.7 Tratamiento de un trastorno pulmonar asociado con SLE

55 Un individuo presenta neumonitis y vasculitis de los pulmones, además de fiebre, debilidad, artralgia (dolor en las articulaciones), diplopía (visión doble), estrabismo e hipoestesia en ambas manos y pies, microhematuria (cantidad detectable de sangre en la orina), hipocomplementemia y títulos elevados de anticuerpos autoinmunes. Se realiza un diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (SLE). El individuo es refractario a la pulsoterapia con metilprednisolona, y a la ciclofosfamida. Al individuo se le administran 1×10^9 to 5×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en una disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa, y se le administra una segunda dosis 7 días

después. El individuo es monitorizado durante los próximos 30-100 días para determinar la reducción de la función pulmonar, como lo indica la reducción del volumen espiratorio forzado (FEV₁) o la capacidad vital forzada (FVC), o una reducción de la relación FEV₁/FVC. Dada la afección del individuo, la administración de células madre placentarias se considera eficaz si cualquiera de estos indicadores no empeora.

5 5.1.8 Tratamiento de un trastorno pulmonar asociado con IBD

Un individuo, previamente diagnosticado con enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), presenta disnea no asociada con sulfasalazina o ácido 5-aminosalicílico. Se descartaron otras causas de la disnea (por ejemplo, alergias, asma, y similares). El individuo es además refractario a los esteroides orales y a la terapia inmunosupresora. Ante la sospecha de que el individuo tiene afectación pulmonar de la IBD, al individuo se le administran 5×10^8 a 1×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en una disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa. El individuo es monitorizado durante los próximos 7-14 días para mejorar la disnea, según lo evaluado mediante al menos una mejoría del 10% en el volumen espiratorio forzado (FEV₁) o la capacidad vital forzada (FVC), o una mejoría de la relación FEV₁/FVC hasta al menos 75%.

5.1.9 Tratamiento de un trastorno pulmonar asociado con esclerodermia

Un individuo, previamente diagnosticado con esclerodermia, presenta una afectación pulmonar diagnosticada como enfermedad pulmonar intersticial, como lo demuestra la reducción en la capacidad de difusión por respiración única para monóxido de carbono (DLCO) en comparación con la normal, confirmada por la presencia de linfocitos y eosinófilos en el lavado broncoalveolar. Al individuo se le administran 5×10^8 a 1×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en una disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa. El individuo es monitorizado durante los próximos 30-100 días para cualquier mejoría detectable en la DLCO, disnea y/o la presencia de linfocitos y eosinófilos en el lavado broncoalveolar; cualquier reducción es una indicación de que la administración de las células madre placentarias es eficaz.

5.1.10 Tratamiento de enfermedad pulmonar intersticial

Un individuo se presenta con disnea, pérdida de peso, tos seca, no productiva, y una relación FEV₁/FVC de <80%. Se realiza un diagnóstico de enfermedad pulmonar intersticial (ILD). Debido a que la causa de la enfermedad pulmonar no es evidente, la enfermedad pulmonar se caracteriza como idiopática. Al individuo se le administran 5×10^8 a 1×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa. El individuo es monitorizado al menos una vez al mes durante un año para cualquier mejoría detectable en, o empeoramiento del, volumen espiratorio forzado (FEV₁) o capacidad vital forzada (FVC), o una reducción de la relación FEV₁/FVC. La administración de células madre placentarias se considera eficaz si cualquiera de estos indicadores no empeora. Si se produce empeoramiento de cualquiera de estos parámetros, al individuo se le administra una dosis de seguimiento al mismo nivel que la dosis inicial.

Un segundo individuo se presenta con disnea, pérdida de peso, tos seca, no productiva, y una relación FEV₁/FVC de <80%. Se realiza un diagnóstico de enfermedad pulmonar intersticial (ILD). La ILD se debe aparentemente a exposición reciente a asbestos, como lo confirma el historial de trabajo, estertores inspiratorios secos, y una radiografía de tórax que muestra placas sobre el diafragma. Al individuo se le administran 5×10^8 a 1×10^9 de células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en una disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa, opcionalmente en combinación con un corticosteroide oral. El individuo es monitorizado al menos una vez al mes durante el resto de la vida del individuo para detectar cualquier mejoría detectable, o disminución del empeoramiento, del volumen espiratorio forzado (FEV₁) o capacidad vital forzada (FVC), o una reducción de la relación FEV₁/FVC. Dada la afección del individuo, la administración de células madre placentarias se considera eficaz si cualquiera de estos indicadores no empeora. Si se produce un empeoramiento de cualquiera de estos parámetros, al individuo se le administra una dosis de seguimiento al mismo nivel que la dosis inicial.

5.1.11 Tratamiento de enfermedad pulmonar intersticial

Un individuo se presenta con disnea, tos persistente, y agrandamiento del tórax (hiperaireación). El individuo muestra una relación FEV₁/FVC de <60% incluso con terapia broncodilatadora. Sobre la base del historial del individuo como fumador, se realiza un diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (enfisema). Al individuo se le administran 5×10^8 a 1×10^9 células madre placentarias CD10⁺CD34⁻CD105⁺CD200⁺ en una disolución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa, opcionalmente en combinación con un broncodilatador tal como albuterol y un corticosteroide inhalado. El individuo es monitorizado por espirometría al menos una vez al mes durante el resto de su vida para detectar cualquier mejoría, o disminución del empeoramiento, del volumen espiratorio forzado (FEV₁) o la capacidad vital forzada (FVC), o una reducción de la relación FEV₁/FVC. Dada la afección del individuo, se considera que la administración de células madre placentarias es eficaz si cualquiera de estos indicadores no empeora.

55 5.2 Ejemplo 2: Localización específica pulmonar de células madre placentarias

La biodistribución de células madre placentarias se evaluó en ratones inmunocomprometidos.

En un estudio piloto, se administraron células madre placentarias CD10⁺CD34⁺CD105⁺CD200⁺ como una inyección intravenosa única y/o de repetición en la cola a ratones machos y hembras NOD-SCID o machos C57BL/10SgSnAi-Rag2(tmi)yc(tmi) (Taconic Farms, Germantown, New York). Los ratones se sacrificaron a los 4, 14, 28 ó 47 días después del tratamiento y mediante Q-PCR se procesaron y analizaron muestras de pulmón, hígado, corazón, riñones, bazo, glándulas suprarrenales, médula ósea, y cerebro. Después de la administración IV, se detectó DNA humano en DNA total aislado de muestras de pulmón, cerebro, corazón y/o hígado en ratones que fueron sacrificados 4 días después de la dosis. Los niveles más altos de DNA se detectaron en el pulmón. Los resultados indicaron que la biodistribución de células madre placentarias se limitó principalmente al pulmón en el día 4 posterior al tratamiento. No se detectó DNA humano en muestras de tejido de ratón sacrificadas en los días 14, 28 ó 47 después del tratamiento.

Se realizó un segundo estudio en el que se evaluaron ratones, administrados con células madre placentarias como una sola dosis o dosis IV de repetición en los días 1, 4 y 7, para la biodistribución y persistencia de las células madre placentarias mediante detección del gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT). Los ratones se sacrificaron a las 4 y 24 horas después de la primera dosis IV de células madre placentarias así como a las 4 horas posteriores a la dosis el día 7 (3^a dosis de repetición) y los días 37 y 92. Se detectó DNA humano a las 4 horas posteriores a la dosis en la mayoría de los tejidos analizados que incluyen la mayoría de las muestras de pulmón, sitio de inyección, hígado, bazo, y corazón, lo que indica la distribución temprana de células a órganos con mayor flujo sanguíneo. Sin embargo, 24 horas después de la dosis, solo el tejido pulmonar albergaba sistemáticamente DNA humano, mientras que otros tejidos, excepto los sitios de inyección y una muestra de cerebro estaban libres de DNA humano. 7 días después de la dosis, solo el pulmón y un pequeño número de sitios de inyección seguían siendo positivos para el DNA humano. El día 37, solo una muestra de tejido pulmonar era débilmente positiva para el DNA humano. No se detectó DNA humano en ningún tejido de ningún animal evaluado el día 92. Después de las inyecciones IV de repetición de 1 x 10⁶ células/ratón, se detectaron células madre placentarias en los mismos tejidos 4 horas después de la tercera inyección como se detectaron 4 horas después de una sola inyección IV, y todos los tejidos estaban completamente libres de DNA el día 92.

5.3 Ejemplo 3: Análisis de células madre placentarias en un modelo de bleomicina de ratones C57Bl/6

Este ejemplo proporciona estudios que demuestran la eficacia de las células madre placentarias en el tratamiento de la enfermedad pulmonar fibrótica. En este ejemplo, las células madre placentarias son células de placenta CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ adherentes a plástico de cultivo tisular, expandidas en cultivo. Las células son cariotípicamente normales después de la expansión, y se proporcionan a una concentración de aproximadamente 7,5 x 10⁶ células/mL.

Estudio utilizando ratones

La bleomicina es un fármaco citostático comúnmente utilizado en el tratamiento del cáncer. La administración de bleomicina normalmente da como resultado inflamación pulmonar crónica que puede progresar a fibrosis. Como tal, la administración de bleomicina a animales experimentales es un modelo aceptado de fibrosis pulmonar en humanos.

Ochenta y cuatro ratones C57CL6 macho, de 6 semanas de edad y un peso de 20-22 gramos, se aclimatan durante 72 horas, después se asignan en docenas a uno de los siete grupos diferentes: (1) administración de disolución salina (control negativo); (2) bleomicina; (3) disolución salina + 1,5 x 10⁶ células madre placentarias; (4) bleomicina + vehículo; (5) bleomicina + 1,5 x 10⁶ células madre placentarias; (6) bleomicina (en disolución de NaCl al 0,9%) + 1,5 x 10⁶ fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDFs); y (7) bleomicina + pirfenidona. La bleomicina, la disolución salina, y las células se administran por vía intravenosa en la vena de la cola en disolución de 400 µL. La pirfenidona se administra por vía oral 400 mg/kg/día en carboximetilcelulosa al 0,5%. Dentro de cada grupo, se sacrifican seis ratones el día 10 después de la administración, y los seis restantes se sacrifican el día 21 después de la administración.

Los resultados de la administración se evalúan mediante lavado broncoalveolar (BAL) e inmunohistoquímica. Los niveles de TNF-α, TGF-β, factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleuquina-13 (IL-13), IL-1β, IL-10 y niveles de IL-8 en fluido BAL y el homogeneizado de pulmón se determinan mediante ELISA o metodología comparable.

Para la inmunohistoquímica, los lóbulos pulmonares se perfunden con formalina + un cóctel inhibidor de la fosfatasa. La extensión del depósito de colágeno se analiza en parte midiendo la cantidad de hidroxiprolina en el tejido pulmonar. Brevemente, los pulmones se homogeneizan en 5 mL de disolución salina, se digieren en 2 mL de HCl 6N durante 16 horas a 110°C. Después de la neutralización con NaOH hasta pH 7, se añade después un ml de reactivo de cloramina T de 0,5 moles/L y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añade después 1 ml de ácido perclórico 3,15 N y P-dimetilaminobenzaldehído a cada muestra y se incuba durante 20 minutos a 65°C. Las muestras se enfrían durante 10 minutos, después se leen a 557 nm en un espectrofotómetro usando concentraciones de trans-24-hidroxi-L-prolina de 0 a 5 mg/ml como una curva estándar. Mayores cantidades de

hidroxiprolina indican mayores cantidades de depósito de colágeno. Ver Krishna, G., et al. *Am. J. Path.* 158:997-1004 (2001).

La histopatología incluye el examen de los tejidos pulmonares para la evidencia de fibrosis o loci fibrótico. Las células madre placentarias se identifican mediante tinción con un antibiótico específico para vimentina humana.

- 5 La eficacia de las células madre placentarias se establece mediante una demostración de un nivel más bajo de cualquier citoquina relacionada con la inflamación en comparación con los controles de bleomicina, o un nivel significativamente más bajo de hidroxiprolina en homogeneizados de pulmón en presencia de células madre placentarias en comparación con los controles de bleomicina.

Estudio usando ratas

- 10 Sesenta ratas SD® macho (Charles River Laboratories), de 7-8 semanas de edad y con peso aproximado de 176-225 g, se dividen en cinco grupos a: (1) dosificación intratraqueal de vehículo (disolución de NaCl al 0,9%) seguida en 15 minutos por dosificación intravenosa de vehículo; (2) dosificación intratraqueal de vehículo seguida en 15 minutos por dosificación intravenosa de $4,0 \times 10^6$ células madre placentarias en 800 μ L de disolución; (3) dosificación intratraqueal de bleomicina (por ejemplo, BLENOXANE®, 3 unidades por kg) seguida en 15 minutos por dosificación intravenosa del vehículo; (4) dosificación intratraqueal de bleomicina (3 unidades por kg) seguida en 15 minutos por dosificación intravenosa de $1,0 \times 10^6$ células madre placentarias en 800 μ L de disolución; y (5) dosificación intratraqueal de bleomicina (3 unidades por kg) seguida en 15 minutos por dosificación intravenosa de $4,0 \times 10^6$ células madre placentarias en 800 μ L de disolución.

- 20 Después de 15 días, los animales son evaluados para diversos parámetros fisiológicos. Todos los animales son evaluados para el peso corporal. Se extrae sangre (0,2 mL) de todos los animales a través de la vena yugular y se analiza para los gases periféricos, y se extraen otros ~3,5 mL a través del seno periorbital para la extracción de suero. El análisis de gases en sangre incluye el análisis de pH, pCO_2 , pO_2 , $aHCO_3$ (HCO_3 real), tCO_3 , medidas de CO-oximetría (por ejemplo, hemoglobina, oxihemoglobina fraccional, oxihemoglobina saturada, carboxihemoglobina, y metahemoglobina).

- 25 Todos los animales se someten adicionalmente a pruebas antemortem para la función pulmonar usando un flexiVent (SCIREQ®), y se recogen datos para la resistencia newtoniana (medición de la resistencia de las vías aéreas centrales) y flexibilidad.

- 30 Se sacrifican seis animales en cada grupo, y los pulmones se analizan para determinar el peso en húmedo, relación de peso a peso del animal, depósito de colágeno (mediante ensayo de hidroxiprolina; ver más arriba); e histopatología (para la fibrosis, y la puntuación de la inflamación por tinción H&E). Para los seis animales restantes de cada grupo, se realiza un lavado broncoalveolar y el fluido de lavado se analiza para el recuento total de leucocitos.

- 35 Los datos recogidos en el estudio, como se ha descrito anteriormente, se analizan mediante análisis de varianza, comparando el grupo 1, anterior, con los grupos 2-5; comparando el grupo 2 con los grupos 4 y 5; comparando el grupo 3 con los grupos 4 y 5; y la comparación del grupo 4 con el grupo 5. Se espera que el efecto global del tratamiento sea significativo ($p < 0,05$). Se espera que la administración de células madre placentarias proporcione un beneficio significativo a animales tratados con bleomicina que reciben las células (grupos 4 y 5) en comparación con los animales tratados con bleomicina que no reciben las células (grupo 3), con respecto a al menos uno de función pulmonar, según se determina mediante flexiVent, fibrosis (según se determina por las pruebas de hidroxiprolina para el depósito de colágeno), o la inflamación (como lo demuestra la reducción de las células relacionadas con la inflamación presentes en los fluidos de lavado broncoalveolar, o inmunohistoquímica del tejido pulmonar).

5.4 Ejemplo 4: Estudio preclínico del tratamiento de la inflamación pulmonar usando un modelo animal

Este ejemplo describe la conducta de un estudio preclínico que demuestra que las células madre placentarias aisladas, administradas por vía intravenosa, reducen la inflamación de las vías respiratorias.

- 45 En el experimento se usaron ratones machos C57BL/6 de 8-12 semanas de edad (emparejados por edad) alojados en grupos. Los ratones se mantienen en un ciclo de luz:oscuridad/12 AM:12 PM en una instalación de barrera. Los alimentos y los líquidos para beber están disponibles *ad libitum*.

- 50 El experimento incluye siete grupos de tratamiento, consistiendo cada uno en 18 ratones. Los ratones en los grupos 1-4 y 6 reciben instilación en las vías respiratorias de lipopolisacárido bacteriano (LPS), un inductor estándar de la inflamación una vez al día durante el transcurso de cinco días para inducir una inflamación de las vías respiratorias que es de moderada a grave por examen histológico. Los ratones de los grupos 1 y 2 reciben células madre placentarias aisladas o células madre placentarias a $0,5$ ó $1,0$ millón de células por animal mediante inyección i.v., por ejemplo en la vena de la cola. Los ratones del grupo 3 se inyectan con fibroblastos dérmicos humanos a $1,0$ millón de células por animal mediante inyección i.v. y sirven como un control negativo celular. Los ratones del grupo 4 reciben vehículo y sirven como grupo control negativo de referencia. Los ratones del grupo 5 sirven como un grupo de control de la enfermedad, y son instilados con disolución salina tamponada con fosfato, pero no reciben ningún

5 LPS. El tratamiento se realizó 1 hora después de la administración de LPS. Los ratones del grupo 6 sirven como control positivo, y reciben un compuesto de referencia, dexametasona, a 10 mg/kg, para ser administrada por inyección i.p. 1 hora después de la exposición al LPS. Los ratones del grupo 7 reciben solo una administración i.v. de 1,0 millón de células madre placentarias o células madre placentarias, para controlar la administración de las células, por ejemplo sobre la infiltración de macrófagos en los tejidos pulmonares.

10 La inflamación pulmonar se induce mediante administración de 2 µL de LPS en 30 µl de PBS a través de instilación intra-traqueal una vez al día durante cinco días. El grupo de control de la enfermedad se instila con un volumen igual de disolución salina tamponada con fosfato. Cada grupo de tratamiento se divide en tres subgrupos de 6 ratones cada uno. Los grupos de 6 ratones se someten a lavado broncoalveolar (BAL) y recogida de tejido a las 6, 24 ó 48 horas después de la exposición al LPS.

15 Se recogen las siguientes muestras de cada animal a las 6, 24 y 48 horas: sangre periférica; fluido BAL, recogido instilando 3 x 1 ml de albúmina de suero bovino al 0,1% en disolución salina tamponada con fosfato a través de una cánula traqueal; y los pulmones. La composición celular del fluido de lavado broncoalveolar se determina mediante análisis FACS con anticuerpos anti-Gr1, anti-CD11b (Mac1) y anti-CD45 un FACScan de Becton Dickinson. La composición celular del lavado se expresa como porcentaje de las células Gr1⁺ y CD11b⁺ de la población de linfocitos bloqueados. Uno de los pulmones se homogeneiza y se usa para determinar los niveles de TNFα, IL-1β, mKC (homólogo de IL-8 de ratón), IL-10, MIP-1α y MIP-2 se determinan en el homogeneizado. El segundo pulmón se fija en formalina al 10% y se procesa para el análisis histopatológico por H&E. Los niveles de TNFα, IL-1β, mKC, IL-10, MIP-1α y MIP-2 se miden también en los sueros de los ratones mediante ELISA.

20 La extensión de la inflamación de las vías respiratorias se determina mediante análisis de la infiltración de neutrófilos detectable por el análisis FACS de los fluidos de lavado pulmonar y broncoalveolar, con un aumento en las células CD45⁺CD11b⁺ que representan principalmente monocitos/macrófagos y granulocitos polimórficos, y las células CD45⁺Gr1⁺ son en su mayoría neutrófilos y granulocitos polimórficos. La administración de células madre placentarias después de la inducción de la inflamación provoca una reducción significativa de las células CD45⁺CD11b⁺, células CD45⁺Gr1⁺, o ambas, presentes en los fluidos de lavado pulmonar o broncoalveolar. La inflamación se determina también por los niveles en los fluidos BAL de TNFα, IL-1β, mKC, IL-10, MIP-1α y MIP-2. La administración de células madre placentarias reduce los niveles de una o más, o todas estas citoquinas. El tratamiento con dexametasona (compuesto de referencia) a 10 mg/kg disminuye el reclutamiento de neutrófilos a los pulmones y lavado después de la administración de LPS.

30

REIVINDICACIONES

1. Células madre placentarias para usar en un método para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección pulmonar, en donde el método comprende la administración de la célula madre placentaria a un individuo en una cantidad terapéuticamente eficaz, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una detectable mejoría en uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o afección, en donde las células madre placentarias son CD10⁺, CD34⁺, CD200⁺, y CD105⁺, como pueden detectarse por citometría de flujo, y en donde el método comprende detectar dicha mejoría mediante uno o más de medidor de flujo máximo, detección de niveles de CO₂ en la sangre, radiografía, tomografía computarizada, imágenes de resonancia magnética, broncoscopia o lavado bronqueolar.
2. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad, trastorno o afección es:
- (a) asociada con, o causada por, una respuesta inmune;
 - (b) una enfermedad pulmonar intersticial;
 - (c) una enfermedad pulmonar obstructiva;
 - (d) una lesión pulmonar aguda; o
 - (e) una lesión pulmonar causada por una enfermedad neoplásica o paraneoplásica, neumonía, o fibrosis quística.
3. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 2, en donde dicha enfermedad, trastorno o afección asociada con, o causada por, una respuesta inmune es una enfermedad autoinmune, o una enfermedad de injerto contra el huésped.
4. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 3, en donde dicha enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, esclerodermia, enfermedad inflamatoria del intestino, o lupus eritematoso sistémico.
5. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 2, en donde dicha enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar intersticial.
6. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 2, en donde dicha enfermedad pulmonar obstructiva es asma, bronquitis, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
7. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 2, en donde dicha lesión pulmonar aguda está causada por una quemadura química, inhalación de humo, o exposición a una sustancia tóxica.
8. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 2, en donde dicha enfermedad, trastorno o afección es una lesión pulmonar causada por enfermedad neoplásica o paraneoplásica, neumonía, o fibrosis quística, y en donde dicha administración da como resultado una relación de volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁) a capacidad vital forzada (FVC) superior a 0,7.
9. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 1, en donde dichas células madre placentarias con CD90⁺ y CD45⁻, como pueden detectarse por citometría de flujo.
10. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 9, en donde dichas células madre placentarias son CD44⁺, como pueden detectarse por citometría de flujo.
11. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 9, en donde dichas células madre placentarias son CD80⁻ y CD86⁻, como pueden detectarse por citometría de flujo.
12. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 1, en donde dichas células madre placentarias son una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺, como pueden detectarse por citometría de flujo.
13. Las células madre placentarias para el uso de la reivindicación 1, en donde dichas células madre placentarias son al menos una de CD200⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻, CD80⁻, CD86⁻, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁻, o PDL⁺.