

ANGIOGÉNESIS USANDO CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS ESTIMULADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos NO. 62/166.504, presentada el 26 de mayo de 2015, cuya divulgación se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

1. CAMPO

5 **[0002]** Se proporcionan en la presente métodos para el uso de células placentarias adherentes a plástico de cultivo de tejidos, por ejemplo, células madre placentarias, denominadas en la presente PDACs, que se han estimulado con una o más citoquinas, para promover la angiogénesis y para tratar enfermedades o trastornos del sistema circulatorio, por ejemplo, enfermedades o trastornos asociados con, o resultantes de,
10 vascularización inadecuada o sangre flujo, o tratables mediante la mejora de la angiogénesis.

2. FUNDAMENTO

[0003] La placenta es una fuente particularmente atractiva de células madre. Debido a que las placentas de mamíferos son abundantes y normalmente se descartan como
15 desechos médicos, representan una fuente única de células madre médicamente útiles. Se proporcionan en el presente documento tales células madre placentarias aisladas, poblaciones de células madre placentarias, y métodos para usarlas para promover la angiogénesis, y para tratar enfermedades o trastornos del sistema circulatorio, por ejemplo, enfermedades o trastornos tratables mediante la promoción de la
20 angiogénesis.

3. RESUMEN

[0004] En un aspecto, se proporciona cultivo de tejidos de células placentarias adherentes al plástico, por ejemplo, células madre placentarias, también denominadas PDACs (células adherentes derivadas de placenta, por ejemplo, las células adherentes
25 derivadas de placenta descritas en la Sección 5.2 a continuación) que han sido estimuladas con una o más citoquinas. En ciertas modalidades, las PDAC estimuladas se estimulan con citoquinas proinflamatorias. En modalidades específicas, las citocinas

proinflamatorias comprenden uno o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , y/o INF- γ . En una modalidad específica, la citoquina proinflamatoria es IL-1 β .

[0005] En una modalidad específica, las PDAC estimuladas proporcionadas en este documento se adhieren al plástico de cultivo tisular y son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺,

5 CD200⁺, como se determina mediante, por ejemplo, citometría de flujo.

[0006] En algunas modalidades, las PDACs estimuladas descritas en la presente (por ejemplo, PDACs estimuladas por IL-1 β) secretan factores proangiogénicos a un nivel más alto que las PDACs no estimuladas (por ejemplo, PDACs que no se han estimulado con una citocina, por ejemplo, una citoquina pro-inflamatoria, por ejemplo, IL-1 β). En una modalidad específica, dichos factores secretados comprenden GM-CSF, G-CSF, IL-6, GRO, MCP-1, folistatina y/o IL-8. En modalidades específicas, dichas PDACs estimuladas descritas en este documento (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β) tienen propiedades pro-angiogénicas.

[0007] En otro aspecto, se proporcionan en la presente métodos para tratar un individuo

15 que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de cultivo de tejidos de células placentarias adherentes al plástico, por ejemplo, células madre placentarias, también mencionadas en este documento como PDACs (células adherentes derivadas de placenta, por ejemplo, las células adherentes derivadas de placenta descritas en la Sección 5.2 a continuación) que se han estimulado con una o más citocinas, en donde dichas PDACs estimuladas se administran al individuo en una cantidad y durante un tiempo suficiente para la mejora detectable de uno o más síntomas de dicha enfermedad o trastorno. En ciertas modalidades, las PDACs estimuladas se estimulan con citoquinas proinflamatorias. En modalidades específicas, las citocinas proinflamatorias comprenden uno o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , y/o INF- γ . En una modalidad específica, la citoquina proinflamatoria es IL-1 β .

[0008] En una modalidad específica, se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , por ejemplo, las PDACs CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1 β . En una modalidad específica, dichas PDACs

30

estimuladas se formulan como una composición farmacéutica. En una modalidad específica, dicha enfermedad o trastorno es infarto de miocardio. En otra modalidad específica, dicha enfermedad o trastorno es insuficiencia cardíaca congestiva. En otra modalidad específica, dicha enfermedad o trastorno es cardiomiopatía.

5 **[0009]** En otra modalidad específica, la enfermedad o trastorno tratado con PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , por ejemplo, CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ PDACs estimuladas con IL-1 β , es úlcera de pie diabético (DFU). En una modalidad específica, un sujeto con DFU tratada de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente, tiene diabetes tipo I. En otra modalidad específica, un
10 sujeto con DFU tratada de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente, tiene diabetes tipo II. En ciertas modalidades, un sujeto tratado de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento tiene más de una DFU, por ejemplo, el sujeto tiene más de una DFU en un solo pie, o al menos una DFU en cada pie. En una modalidad específica, el sujeto tiene una o más DFU en la parte inferior de un pie, o
15 ambos pies. En ciertas modalidades, un sujeto tratado de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente tiene neuropatía periférica, por ejemplo, daño a uno o más de los nervios en las piernas y/o los pies.

[0010] En ciertas modalidades, un sujeto con DFU tratada de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente tiene DFU con una afección que causa una interrupción
20 en el flujo de sangre en la vasculatura periférica del sujeto. En una modalidad específica, el sujeto tiene enfermedad arterial periférica (PAD). En ciertas modalidades, dicha DFU es causada por y/o está asociada con PAD.

[0011] En ciertas modalidades, los métodos de tratamiento de DFU proporcionados en la presente dan como resultado una mejora detectable de uno o más síntomas de DFU
25 en un sujeto tratado de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento. Los síntomas de ejemplo de DFU incluyen, sin limitación, llagas, úlceras o ampollas en el pie y/o la parte inferior de la pierna; dolor en el pie (o los pies) y/o la parte inferior de la pierna; dificultad para caminar; decoloración en el pie (o pies), por ejemplo, el pie (o los pies) aparecen en negro, azul y/o rojo; y signos de infección (por ejemplo, fiebre,
30 enrojecimiento de la piel y/o hinchazón).

[0012] En ciertas modalidades, los métodos para tratar la DFU proporcionados en la presente comprenden administrar PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) a un sujeto que tiene DFU en una cantidad y durante un tiempo suficiente para una mejora detectable en uno o más

5 indicios de mejora, en donde dichos indicios de mejora incluyen (i) reducción en el tamaño de la úlcera; (ii) cierre de la úlcera: cierre de la piel de una o más úlceras sin drenaje o la necesidad de apósito; (iii) retención del cierre de la úlcera durante un período de tiempo específico después del cierre, por ejemplo, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o 6 semanas después del cierre; (iv) aumento del tiempo para

10 el cierre de la úlcera; (v) mejora en el índice braquial de tobillo (ABI), una prueba que mide la presión sanguínea en el tobillo y en el brazo mientras el sujeto está en reposo y luego se repite mientras el sujeto está en movimiento (ej., caminando sobre una cinta rodante). que puede usarse para predecir/evaluar la severidad de PAD; (vi) mejora en el índice braquial del dedo del pie (LCT), una prueba análoga a ABI que utiliza la

15 presión sanguínea del dedo del pie frente a la presión arterial del tobillo; (vii) mejora en el nivel de oxígeno transcutáneo, es decir, el nivel de oxígeno en el tejido debajo de la piel cerca de la úlcera (véase, por ejemplo, Ruangsetakit y col., J Wound Care, 2010, 19 (5): 202-6); (viii) mejora en el registro del volumen del pulso, que es una prueba vascular no invasiva en la que se utilizan los manguitos de presión sanguínea y un

20 dispositivo de ultrasonido manual para obtener información sobre el flujo sanguíneo arterial en los brazos y las piernas; (ix) tiempo hasta la amputación mayor, por ejemplo, amputación por encima del tobillo; (x) mejora en la escala de Clasificación de Wagner, que evalúa la profundidad de la úlcera y la presencia de osteomielitis o gangrena mediante un sistema de clasificación: grado 0 (lesión pre o post ulcerativa), grado 1

25 (úlceras de espesor parcial/completo), grado 2 (examen del tendón o cápsula), grado 3 (profundo con osteítis), grado 4 (gangrena parcial del pie) y grado 5 (gangrena completa del pie); (xi) mejoría en los criterios de Rutherford, que se usa para la estadificación de la enfermedad arterial periférica, tiene siete etapas de clasificación: Etapa 0 - Asintomática, Etapa 1 - Claudicación leve, Etapa 2 - Claudicación moderada,

30 Etapa 3 - Claudicación grave, Etapa 4 - Dolor en reposo, Etapa 5 - Ulceración isquémica que no excede la úlcera de los dedos del pie y Etapa 6 - úlceras isquémicas

graves o gangrena franca; y (xii) mejora en el puntaje de dolor en reposo de la pierna, una escala de dolor de 0-10 con 0 sin dolor y 10 que representa dolor máximo.

[0013] En ciertas modalidades, los métodos para tratar la DFU proporcionados en la presente comprenden administrar células madre placentarias (por ejemplo, una
5 composición farmacéutica que comprende células madre placentarias) a un sujeto que tiene DFU en una cantidad y durante un tiempo suficiente para una mejora detectable en la calidad de vida del sujeto según se evalúa mediante, por ejemplo, (i) una Encuesta de Salud de Forma Corta de 36 ítems (SF-36) (véase, por ejemplo, Ware, Medical Care 30 (6): 473-483); (ii) la Forma Corta de Escala de Úlcera del Pie Diabético
10 (DFS-SF), que mide el impacto de la úlcera del pie diabético en la calidad de vida (ver, por ejemplo, Bann, Pharmacoeconomics, 2003, 21 (17): 1277-90); (iii) la Impresión Global del Paciente de Escala de Cambio, para evaluar los cambios en la neuropatía a lo largo del tiempo (véase, por ejemplo, Kamper y col., J. Man. Manip. Ther., 2009, 17 (3): 163-170); y/o (iv) la escala EuroQol5D (EQ-5D TM), que es un cuestionario de salud
15 utilizado para obtener un perfil descriptivo y un valor de índice único para el estado de salud de un paciente.

[0014] En otras modalidades, la enfermedad o trastorno tratado con PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , por ejemplo, las PDACs CD34-, CD10 +, CD105 +, CD200+ estimuladas con IL-1 β , es aneurisma, angina,
20 estenosis aórtica, aortitis, arritmias , arteriosclerosis, arteritis, hipertrofia septal asimétrica (ASH), aterosclerosis, fibrilación y aleteo auricular, endocarditis bacteriana, síndrome de Barlow (prolapso de la válvula mitral), bradicardia, enfermedad de Buerger (tromboangeítis obliterante), cardiomegalia, carditis, enfermedad de la arteria carótida, coartación de la aorta, defectos cardíacos congénitos, enfermedad de la arteria
25 coronaria, Síndrome de Eisenmenger, embolia, endocarditis, eritromelalgia, fibrilación, displasia fibromuscular, bloqueo cardíaco, soplo cardíaco, hipertensión, hipotensión, calcificación arterial infantil idiopática, enfermedad de Kawasaki (síndrome de ganglio linfático mucocutáneo, enfermedad del ganglio linfático mucocutáneo, poliarteritis infantil), síndrome metabólico, angina microvascular, miocarditis, taquicardia auricular
30 paroxística (PAT), periarteritis nodosa (poliarteritis, poliarteritis nodosa), pericarditis, enfermedad vascular periférica, isquemia crítica de las extremidades, flebitis, estenosis

de la válvula pulmonar (estenosis pulmonar), enfermedad de Raynaud, estenosis de la arteria renal, hipertensión renovascular, enfermedad cardíaca reumática, vasculopatía diabética, defectos septales, isquemia silente, síndrome X, taquicardia, Arteritis de Takayasu, Tetralogía de Fallot, transposición de los grandes vasos, atresia tricúspide, tronco arterioso, enfermedad cardíaca valvular, úlceras varicosas, venas varicosas, vasculitis, defecto del tabique ventricular, Síndrome de Wolff-Parkinson-White, defecto del cojín endocárdico, fiebre reumática aguda, pericarditis reumática aguda, endocarditis reumática aguda, miocarditis reumática aguda, enfermedades cardíacas reumáticas crónicas, enfermedades de la válvula mitral, estenosis mitral, insuficiencia mitral reumática, enfermedades de la válvula aórtica, enfermedades de otras estructuras endocárdicas, cardiopatía isquémica (aguda y subaguda), angina de pecho, enfermedad cardíaca pulmonar aguda, embolia pulmonar, enfermedad cardíaca pulmonar crónica, enfermedad cardíaca cifoescoliótica, miocarditis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibroelastosis endocárdica, bloqueo auriculoventricular, arritmias cardíacas, degeneración miocárdica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad de las arterias, arteriolas y capilares, o una enfermedad de venas y vasos linfáticos.

[0015] En otras modalidades específicas, la enfermedad o trastorno tratado con PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , por ejemplo, PDACs CD34-, CD10 +, CD105 +, CD200 + estimuladas con IL-1 β , es una oclusión y estenosis de arterias precerebrales, o oclusión de las arterias cerebrales. En una modalidad, se proporciona un método para tratar un individuo que tiene una interrupción del flujo de sangre en el cerebro del individuo o alrededor de él, por ejemplo, que tiene un síntoma o déficit neurológico atribuible a una interrupción del flujo de sangre en o alrededor el cerebro del individuo o el sistema nervioso central (SNC), que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β). En ciertas modalidades, la interrupción del flujo de sangre da como resultado una lesión anóxica o una lesión hipóxica en el cerebro o el SNC del individuo.

[0016] En otras modalidades específicas, la enfermedad o trastorno tratado con PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , por ejemplo, PDACs CD34 $^{-}$,

CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1 β , es una oclusión y estenosis de arterias periféricas. En una modalidad, se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene una interrupción del flujo de sangre en o alrededor de una extremidad, por ejemplo, que tiene un síntoma o déficit vascular atribuible a una interrupción del flujo de sangre en o alrededor del sistema vascular periférico del individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β). En ciertas modalidades, la interrupción del flujo de sangre da como resultado una lesión anóxica o una lesión hipóxica en las extremidades del individuo.

[0017] En una modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en este documento, las PDACs estimuladas (ej., una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran por inyección. En otra modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en este documento, las PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran a un sujeto que se trata mediante implantación en dicho sujeto de una matriz o armazón que comprende células placentarias.

[0018] En una modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en este documento, las PDACs estimuladas (ej., una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran por vía intramuscular. En una modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en este documento, las PDACs estimuladas (ej., una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran por vía intravenosa. En una modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en este documento, las PDACs estimuladas (ej., una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran por vía subcutánea.

En una modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en este documento, las PDACs estimuladas (ej., una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran de manera local. En una modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en este documento, las PDACs estimuladas (ej., una composición farmacéutica que comprende las PDACs estimuladas) se administran de manera sistémica. En otra modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en este documento, las PDACs estimuladas (ej., una composición

farmacéutica que comprende las PDACs estimuladas) se administran directamente al sitio de la enfermedad que se está tratando, por ejemplo, una úlcera, por ejemplo, una úlcera de pie diabético. En otra modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en la presente, las PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición

5 farmacéutica que comprende las PDACs estimuladas) se administran adyacentes o periféricas al sitio de la enfermedad que se está tratando, por ejemplo, una úlcera, por ejemplo, una úlcera de pie diabético. .

[0019] En ciertas modalidades, los métodos de tratamiento descritos en este documento comprenden la administración de aproximadamente 1×10^6 , 3×10^6 , 5×10^6 ,
10 1×10^7 , 3×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 3×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , o 1×10^{10} PDACs estimuladas (por ejemplo, como parte de una composición farmacéutica que comprende las PDACs estimuladas). En ciertas modalidades, los métodos de tratamiento descritos en este documento comprenden la administración de aproximadamente 1×10^6 a 3×10^6 , 3×10^6 a 5×10^6 , 5×10^6 a 1×10^7 , 1×10^7 a 3×10^7 , 3×10^7 a 5×10^7 , 5×10^7 a 1×10^8 , 1×10^8 a 3×10^8 ,
15 3×10^8 a 5×10^8 , 5×10^8 a 1×10^9 , 1×10^9 a 5×10^9 , o 5×10^9 a 1×10^{10} de PDACs estimuladas (por ejemplo, como parte de una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas). En una modalidad específica, los métodos de tratamiento descritos en este documento comprenden la administración de aproximadamente 3×10^6 PDACs estimuladas. En otra modalidad específica, los métodos de tratamiento descritos en
20 este documento comprenden la administración de aproximadamente 1×10^7 PDACs estimuladas. En otra modalidad específica, los métodos de tratamiento descritos en la presente comprenden la administración de aproximadamente 3×10^7 PDACs estimuladss. En otra modalidad específica, los métodos de tratamiento descritos en este documento comprenden la administración de aproximadamente 1×10^8 PDACs
25 estimuladas.

[0020] En una modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en la presente, las PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran intramuscularmente a un sujeto más de una vez, con una semana entre administraciones, por ejemplo, se administran
30 PDACs estimuladas el día 1 (el primer día de administración) y una segunda dosis de PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende

PDACs estimuladas) se administra una semana más tarde (es decir, el día 8). En otra modalidad específica, los métodos comprenden la administración de aproximadamente 3×10^6 PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) en cada día de administración (es decir, los días 1 y 8). En otra modalidad específica, los métodos comprenden la administración de aproximadamente 1×10^7 PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) en cada día de administración (es decir, en los días 1 y 8). En otra modalidad específica, los métodos comprenden la administración de aproximadamente 1×10^7 PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) en cada día de administración (es decir, en los días 3 y 8). En otra modalidad específica, los métodos comprenden la administración de aproximadamente 1×10^8 PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) en cada día de administración (es decir, en los días 1 y 8). En otra modalidad específica, las PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran a un sujeto en al menos tres ocasiones diferentes, con aproximadamente una semana entre administraciones.

[0021] En otra modalidad específica de los métodos de tratamiento descritos en la presente, las PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran a un sujeto más de una vez, con un mes entre administraciones, por ejemplo, se administran PDACs estimuladas el día 1 (el primer día de administración) y una segunda dosis de PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administra aproximadamente un mes después (por ejemplo, los días 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33). En una modalidad específica, los métodos comprenden la administración de aproximadamente 3×10^6 PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende las PDACs estimuladas) en cada día de administración (por ejemplo, 3×10^6 PDACs estimuladas se administran el día 1 y aproximadamente 3×10^6 PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran 1 mes después del día 1, por ejemplo, los días 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33). En otra modalidad específica, los métodos comprenden la

administración de aproximadamente 3×10^7 PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) en cada día de administración (por ejemplo, 3×10^7 PDACs estimuladas se administran el día 1 y aproximadamente 3×10^7 las PDACs estimuladas se administran 1 mes después del día 1, por ejemplo, los días 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33). En otra modalidad específica, los métodos comprenden la administración de aproximadamente 3×10^7 PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) en cada día de administración (por ejemplo, 1×10^8 PDACs estimuladas se administran el día 1 y aproximadamente 1×10^8 las PDACs estimuladas se administran 1 mes después del día 1, por ejemplo, los días 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33). En otra modalidad específica, las PDACs estimuladas (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas) se administran a un sujeto en al menos tres ocasiones diferentes, con aproximadamente un mes entre administraciones.

15 **[0022]** En diversas modalidades, las PDACs estimuladas útiles en los métodos descritos en este documento están contenidas dentro de una población de células, al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células de las que se dice que son PDACs estimuladas. En ciertas modalidades, las PDACs estimuladas en dicha población 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% o 99% de las PDACs estimuladas en dicha población tiene un genotipo fetal, es decir, son de origen fetal. En ciertas modalidades, la población de células que comprende dichas PDACs estimuladas comprende células que tienen un genotipo materno; por ejemplo, al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicha población tienen un genotipo materno, es decir, son de origen materno.

25 **[0023]** En ciertas modalidades, las PDACs estimuladas usadas en los métodos descritos en este documento son autólogas para un receptor. En ciertas modalidades, las PDACs estimuladas usados en los métodos descritos en este documento son heterólogas para un receptor.

[0024] En ciertas modalidades, las PDACs estimuladas usados en los métodos descritos en este documento se crioconservan antes de la administración a un sujeto. En ciertas modalidades, las PDACs estimuladas usadas en los métodos descritos en este documento se obtienen a partir de un banco de células placentarias (por ejemplo, un banco PDAC).

3.1 Definiciones

[0025] Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor numérico establecido, indica un valor dentro de más o menos 10% del valor numérico establecido.

10 **[0026]** Como se usa en este documento, el término "angiogénico", en referencia a las células adherentes derivadas de placenta descritas en la presente, significa que las células pueden formar vasos o brotes similares a vasos, o que las células pueden promover la angiogénesis (por ejemplo, la formación de vasos o estructuras similares a vasos) en otra población de células, por ejemplo, células endoteliales.

15 **[0027]** Como se usa en el presente documento, el término "angiogénesis" se refiere al proceso de formación de vasos sanguíneos que incluye, pero no se limita a, activación, migración, proliferación, remodelación de matriz y estabilización celular de células endoteliales.

20 **[0028]** Como se usa en el presente documento, el término "derivado" significa aislado de o de otra manera purificado. Por ejemplo, las células adherentes derivadas de la placenta se aíslan de la placenta. El término "derivado" abarca células que se cultivan a partir de células aisladas directamente de un tejido, por ejemplo, la placenta, y células cultivadas o expandidas a partir de aislados primarios.

25 **[0029]** Como se usa en este documento, "inmunolocalización" significa la detección de un compuesto, por ejemplo, un marcador celular, usando una proteína inmune, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo en, por ejemplo, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia, clasificación de células magnéticas, hibridación in situ, inmunohistoquímica o similares.

[0030] Como se usa en el presente documento, el término "SH2" se refiere a un anticuerpo que se une a un epítipo en el marcador celular CD105. Por lo tanto, las células que se conocen como SSH2⁺ son CD105⁺.

[0031] Como se usa en el presente documento, los términos "SH3" y "SH4" se refieren a anticuerpos que se unen a epítipos presentes en el marcador celular CD73. Por lo tanto, las células que se denominan SH3⁺ y/o SH4⁺ son CD73⁺.

[0032] Una placenta tiene el genotipo del feto que se desarrolla dentro de ella, pero también está en contacto físico cercano con los tejidos maternos durante la gestación. Como tal, como se usa en el presente documento, el término "genotipo fetal" significa el genotipo del feto, por ejemplo, el genotipo del feto asociado con la placenta a partir del cual se obtienen células placentarias aisladas particulares, tal como se describe en la presente, en oposición al genotipo de la madre que llevó el feto. Como se usa en el presente documento, el término "genotipo materno" significa el genotipo de la madre que portaba el feto, por ejemplo, el feto asociado con la placenta del que se obtienen células placentarias aisladas particulares, tal como se describe en la presente.

[0033] Como se usa en este documento, el término "célula aislada", por ejemplo, "célula placentaria aislada", "célula madre placentaria aislada", y similares, significa una célula que está sustancialmente separada de otras células diferentes del tejido, por ejemplo, placenta, de donde se deriva la célula madre. Una célula está "aislada" si al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o al menos 99% de las células, por ejemplo, células no madre, con las cuales la célula madre es naturalmente asociada, o células madre que muestran un perfil de marcador diferente se eliminan de la célula madre, por ejemplo, durante la recolección y/o cultivo de la célula madre.

[0034] Como se usa en este documento, "multipotente", cuando se refiere a una célula, significa que la célula tiene la capacidad de diferenciarse en algunos, pero no necesariamente todos los tipos de células del cuerpo, o en células que tienen características de algunos, pero no de todos, tipos de células del cuerpo, o más de las tres capas germinales. En ciertas modalidades, por ejemplo, una célula placentaria aislada (PDAC), como se describe en la Sección 5.2 a continuación, que tiene la capacidad de diferenciarse en una célula que tiene características de células neurogénicas, condrogénicas y/u osteogénicas es una célula multipotente.

[0035] Como se usa en el presente documento, el término "población de células aisladas" significa una población de células que está sustancialmente separada de otras células de un tejido, por ejemplo, placenta, de la que se deriva la población de células.

- 5 **[0036]** Como se usa en el presente documento, el término "célula placentaria" se refiere a una célula madre o célula progenitora que está aislada de una placenta de mamífero, por ejemplo, como se describe en la Sección 5.2, o se cultiva a partir de células aisladas de una placenta de mamífero. como "PDACs", ya sea como un aislado primario o una célula cultivada, independientemente del número de pasajes después de
- 10 un cultivo primario. En ciertas modalidades, el término "células placentarias" tal como se usa en la presente, sin embargo, no se refiere a, y las células placentarias usadas en los métodos proporcionados en este documento no son, sin embargo, trofoblastos, citotrofoblastos, sincitiotrofoblastos, angioblastos, hemangioblastos, células germinales embrionarias, células madre embrionarias, células obtenidas a partir de una masa
- 15 celular interna de un blastocisto, o células obtenidas de una cresta gonadal de un embrión tardío, por ejemplo, una célula germinal embrionaria. Las células placentarias, por ejemplo, PDACs, descritas en este documento no son las células adherentes derivadas del amnios descritas en la Solicitud de Patente de Estados Unidos pendiente No. 12/622.352, presentada el 19 de noviembre de 2009, titulada "Células
- 20 Angiogénicas Derivadas del Amnios", cuya divulgación se incorporada en la presente como referencia en su totalidad. Una célula se considera una "célula madre" si la célula muestra atributos 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, y la capacidad de diferenciarse en células
- 25 que muestran características de células diferenciadas de una o más de las tres capas germinales. A menos que se indique lo contrario en este documento, el término "placentario" incluye el cordón umbilical. Las células placentarias aisladas descritas en la presente, en ciertas modalidades, se diferencian in vitro en condiciones de diferenciación, se diferencian in vivo, o ambas.
- 30 **[0037]** Como se usa en este documento, una célula placentaria es "positiva" para un marcador particular cuando ese marcador es detectable por encima del fondo. La

detección de un marcador particular puede, por ejemplo, realizarse mediante el uso de anticuerpos, o mediante sondas de oligonucleótidos o cebadores basados en la secuencia del gen o ARNm que codifica el marcador. Por ejemplo, una célula placentaria es positiva para, por ejemplo, CD73 porque CD73 es detectable en células placentarias en una cantidad detectablemente mayor que el fondo (en comparación, por ejemplo, con un control de isotipo). Una célula también es 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 aislar la célula cuando está presente o expresada por la célula. En el contexto de, por ejemplo, detección mediada por anticuerpo, "positivo", como indicación de que está presente un marcador de superficie celular particular, significa que el marcador es detectable usando un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo marcado fluorescentemente, específico para ese marcador; "positivo" también se refiere a una célula que exhibe el marcador en una cantidad que produce una señal, por ejemplo, en un citómetro, que está detectablemente por encima del fondo. Por ejemplo, una célula es "CD200⁺" donde la célula se marca detectablemente con un anticuerpo específico para CD200, y la señal del anticuerpo es detectablemente más alta que la de un control (por ejemplo, control de fondo o de isotipo). Por el contrario, "negativo" en el mismo contexto significa que el marcador de superficie celular no es detectable usando un anticuerpo específico para ese marcador en comparación con un control (por ejemplo, control de fondo o de isotipo). Por ejemplo, una célula es "CD34⁻" donde la célula no se marca de forma reproducible y detectable con un anticuerpo específico para CD34 en un grado mayor que un control (por ejemplo, control de fondo o de isotipo). Los marcadores no detectados, o no detectables, que usan anticuerpos se determinan como positivos o negativos de una manera similar, usando un control apropiado. Por ejemplo, puede determinarse que una célula o población de células es OCT-4⁺ si la cantidad de ARN OCT-4 detectada en ARN de la célula o población de células es detectablemente mayor que el fondo según se determina, por ejemplo, mediante un método de detectar ARN tal como RT-PCR, transferencias de ranura, etc. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, los marcadores de agrupación de diferenciación ("CD") se detectan usando anticuerpos. En ciertas modalidades, se determina que

OCT-4 está presente, y una célula es "OCT-4 +" si OCT-4 es detectable usando RT-PCR.

[0038] Como se usa en este documento, la designación "baja" cuando se refiere a la expresión de un marcador detectable en citometría de flujo, significa que el marcador se expresa en menos del 10% de las células probadas, o que la fluorescencia atribuible al marcador en, por ejemplo, flujo citometría, tiene menos de 1 registro por encima del fondo.

[0039] Como se usa en el presente documento, "tratar" abarca la reparación, la mejora, la disminución de la gravedad de, o la reducción en el transcurso del tiempo de una enfermedad, trastorno o afección, o cualquier parámetro o síntoma de la misma.

[0040] Como se usa en el presente documento, "estimulado" cuando se usa en el contexto de una célula madre placentaria estimulada (por ejemplo, una PDAC estimulada) se refiere a una célula que ha sido contactada con una o más moléculas que alteran el fenotipo de la célula contactada. Por ejemplo, las células madre placentarias pueden ponerse en contacto con una o más citoquinas que alteran las células de alguna manera. Los cambios observados en una PDAC placentaria estimulada pueden abarcar, por ejemplo, cambios en la expresión génica, secreción de factores solubles o tasas de crecimiento y/o división celular. En una modalidad específica, una PDAC estimulada (por ejemplo, una PDAC que se ha estimulado con una citocina, por ejemplo, una citocina proinflamatoria, por ejemplo, IL-1 β) secreta factores proangiogénicos a un nivel más alto que una PDAC no estimulada (por ejemplo, una PDAC que no ha sido estimulada con una citocina, por ejemplo, una citocina proinflamatoria, por ejemplo, IL-1 β) en las mismas condiciones experimentales o similares. En una modalidad específica, dichos factores proangiogénicos secretados comprenden GM-CSF, G-CSF, IL-6, GRO, MCP-1, folistatina y/o IL-8. En modalidades específicas, dichas PDACs estimuladas descritas en este documento (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β) tienen propiedades pro-angiogénicas.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0041] La Figura 1 muestra los niveles de ciertos factores de crecimiento y citoquinas secretadas por células placentarias adherentes al plástico (PDACs).

[0042] Las Figuras 2A-2C muestran los efectos de los medios condicionados por células PDAC (P-CM) sobre el crecimiento y supervivencia (Figura 2A), la longitud de la red celular (Figura 2B) y el número de tubos celulares formados (Figura 2C) para las células endoteliales vasculares humanas (HUVECs)

5 **[0043]** La Figura 3 muestra los efectos dependientes del tiempo de P-CM en múltiples vías de señalización de fosforilación en HUVECs cultivadas.

[0044] La Figura 4 muestra los efectos del tratamiento con P-CM en la expresión del gen HUVEC durante 48 horas.

10 **[0045]** La Figura 5 muestra los efectos de IL-1 β en diversos factores secretados por PDACs.

[0046] La Figura 6 muestra los efectos del P-CM aislado de las PDACs estimuladas por IL-1 β en las rutas de señalización de células HUVEC.

15 **[0047]** Las Figuras 7A-D muestran los efectos del bloqueo del Factor de Crecimiento Hepático (HGF) durante el tratamiento de HUVECs con P-CM aislado de PDACs estimuladas con IL-1 β para las vías MEK (Figura 7A), ERK1/2 (Figura 7B), STAT3 (Figura 7C), y Akt (Figura 7D).

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

5.1 ANGIOGÉNESIS Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES O CONDICIONES ASOCIADAS O RESULTANTES DE POBRE FLUJO SANGUINEO

20 **[0048]** Se proporcionan en este documento métodos para tratar enfermedades o trastornos del sistema circulatorio que comprenden administrar una cantidad eficaz de células placentarias adherentes al plástico de cultivo tisular, por ejemplo, PDACS, como se describe en la Sección 5.2 siguiente, en donde dichas PDACS se han
25 estimulado con una citocina. En modalidades específicas, dichas PDACS se estimulan con una o más citocinas proinflamatorias. En una modalidad específica, dichas citocinas proinflamatorias comprenden uno o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α y INF- γ . En otra modalidad específica, dicha citocina proinflamatoria es IL-1 β . En ciertas modalidades, las PDACS estimuladas son angiogénicas.

5.1.1 Enfermedades del Sistema Circulatorio

[0049] Las PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β y poblaciones de tales células, proporcionadas en la presente pueden usarse para tratar individuos que exhiben una variedad de estados o condiciones patológicas que se beneficiarían del aumento de la angiogénesis. Ejemplos de dichos estados o condiciones incluyen infarto de miocardio, enfermedad arterial periférica, síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, úlcera diabética, úlcera de decúbito, úlcera venosa, úlcera arterial, quemaduras, fracturas no articulares, osteoartritis y reparación ósea maxilofacial. Las PDACs estimuladas, y las poblaciones de tales células, pueden, en ciertas modalidades, usarse para promover la angiogénesis en individuos que exhiben pérdida traumática de tejido, o para prevenir la formación de cicatrices, o en individuos que tienen reemplazo total de articulación o prótesis dentales. En una modalidad específica, dicha enfermedad o trastorno es insuficiencia cardíaca congestiva.

[0050] En una modalidad específica, las PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , y las poblaciones de tales células, proporcionadas en este documento, pueden usarse para tratar a un individuo que tiene una insuficiencia del sistema circulatorio, por ejemplo, y un individuo que tiene enfermedad vascular periférica o enfermedad de las arterias coronarias.

[0051] En un aspecto, se proporcionan métodos para tratar un paciente con una enfermedad o lesión cardíaca que comprenden administrar una composición celular terapéutica a un paciente con una enfermedad o lesión cardíaca o enfermedad del sistema circulatorio, y evaluar al paciente por mejoras la función cardíaca, en donde dicha composición celular comprende PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β) como se describe en este documento. En una modalidad, la enfermedad cardíaca es una miocardiopatía. En modalidades específicas, la miocardiopatía es idiopática o una miocardiopatía con una causa conocida. En otras modalidades específicas, la miocardiopatía es de naturaleza isquémica o no isquémica. En otras modalidades, la enfermedad cardíaca o del sistema circulatorio comprende uno o más de la angioplastia, aneurisma, angina (angina de pecho), estenosis aórtica, aortitis, arritmias, arteriosclerosis, arteritis, hipertrofia septal asimétrica (ASH), aterosclerosis, fibrilación auricular y aleteo, endocarditis bacteriana, síndrome de

Barlow (prolapso de la válvula mitral), bradicardia, Enfermedad de Buerger (tromboangiitis obliterante), cardiomegalia, cardiomiopatía, carditis, enfermedad de la arteria carótida, coartación de la aorta, enfermedades cardíacas congénitas (defectos congénitos del corazón), enfermedad de arterias coronarias, síndrome de

5 Eisenmenger, embolia, endocarditis, eritromelalgia, fibrilación, displasia fibromuscular, bloqueo cardíaco, soplo cardíaco, hipertensión, hipotensión, calcificación idiopática arterial infantil, enfermedad de Kawasaki (síndrome del nódulo linfático mucocutáneo, enfermedad del nodo linfático mucocutáneo, poliarteritis infantil), síndrome metabólico, angina microvascular, infarto de miocardio (ataques al corazón), miocarditis, taquicardia

10 paroxística auricular (PAT), periarteritis nodosa (poliarteritis, poliarteritis nodosa), pericarditis, enfermedad vascular periférica, isquemia crítica de las extremidades, vasculopatía diabética, flebitis, estenosis de válvulas pulmonares (estenosis pulmonar), Enfermedad de Raynaud, estenosis de arterias renales, hipertensión renovascular, cardiopatía reumática, defectos septales, isquemia silenciosa, síndrome X, taquicardia,

15 arteritis de Takayasu, tetralogía de Fallot, transposición de los vasos mayores, atresia tricúspide, tronco arterioso enfermedad cardíaca valvular, úlceras varicosas, venas varicosas, vasculitis, defecto septal ventricular, Síndrome de Wolff-Parkinson-White o defecto del cojín endocárdico. En una modalidad específica, dicha enfermedad o trastorno es insuficiencia cardíaca, por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva.

20 **[0052]** En otras modalidades, la enfermedad cardíaca o del sistema circulatorio comprende uno o más de fiebre reumática aguda, pericarditis reumática aguda, endocarditis reumática aguda, miocarditis reumática aguda, enfermedades cardíacas reumáticas crónicas, enfermedades de la válvula mitral, estenosis mitral, insuficiencia mitral reumática, enfermedades de la válvula aórtica, enfermedades de otras

25 estructuras endocárdicas, cardiopatía isquémica (aguda y subaguda), angina de pecho, enfermedades de la circulación pulmonar (cardiopatía pulmonar aguda, embolia pulmonar, enfermedad cardíaca pulmonar crónica), enfermedad cardíaca cifoesclerótica, miocarditis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibroelastosis endocárdica, bloqueo auriculoventricular, disritmias cardíacas, degeneración

30 miocárdica, enfermedades del sistema circulatorio, incluyendo enfermedad cerebrovascular, oclusión y estenosis de arterias precerebrales, oclusión de arterias

cerebrales, enfermedades de arterias, arteriolas y capilares (aterosclerosis, aneurisma), o enfermedades de las venas y vasos linfáticos. En otra modalidad específica, dicha enfermedad o trastorno es la úlcera del pie diabético.

5 **[0053]** En otra modalidad, el tratamiento comprende el tratamiento de un individuo con una miocardiopatía con una composición celular terapéutica que comprende PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , con o sin otro tipo de célula. En ciertas modalidades, el individuo experimenta beneficios por la terapia, por ejemplo, por la capacidad de las células para soportar el crecimiento de otras células, incluyendo células madre o células progenitoras presentes en el corazón, por el crecimiento tisular
10 o la vascularización del tejido, y por la presencia de factores celulares beneficiosos, quimiocinas, citoquinas y similares, pero las células no se integran ni se multiplican en el individuo. En otra modalidad, el paciente se beneficia del tratamiento terapéutico con las células, pero las células no sobreviven durante un período prolongado en el paciente. En una modalidad, las células disminuyen gradualmente en número,
15 viabilidad o actividad bioquímica, en otras modalidades, la disminución en las células puede estar precedida por un período de actividad, por ejemplo, crecimiento, división o actividad bioquímica. En otras modalidades, las células senescentes, no viables o incluso muertas pueden tener un efecto terapéutico beneficioso.

[0054] La mejora en un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema
20 circulatorio, en donde al individuo se administra las PDACs estimuladas o las composiciones terapéuticas proporcionadas en la presente, puede evaluarse o demostrarse mediante una mejora detectable en uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno del sistema circulatorio .

[0055] En otra modalidad, la mejora en un individuo que tiene una enfermedad o
25 trastorno del sistema circulatorio, en donde al individuo se administra las PDACs estimuladas o las composiciones terapéuticas que comprenden las PDACs estimuladas, se puede evaluar o demostrar mediante una mejora detectable en uno o más, indicios de la función cardíaca, por ejemplo, demostración de una mejoría detectable en uno o más de gasto cardíaco (GC) del tórax, índice cardíaco (IC),
30 presiones de la arteria pulmonar en cuña (PAWP) e índice cardíaco (IC), % de acortamiento fraccional (% FS), fracción de eyección (FE), fracción de eyección del

ventrículo izquierdo (FEVI); diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo (LVEDD), diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo (LVESD), contractilidad (por ejemplo, dP/dt), bucles presión-volumen, mediciones del trabajo cardíaco, un aumento en el funcionamiento auricular o ventricular; un aumento en la eficiencia de bombeo, una
5 disminución en la tasa de pérdida de eficiencia de bombeo, una disminución en la pérdida de funcionamiento hemodinámico; y una disminución en las complicaciones asociadas con la miocardiopatía, en comparación con el individuo antes de la administración de PDACs estimuladas.

[0056] La mejora en un individuo que recibe las PDACs estimuladas, por ejemplo,
10 PDACs estimuladas con IL-1 β , o composiciones terapéuticas que comprenden PDACs estimuladas, proporcionada en este documento también puede evaluarse mediante parámetros subjetivos, por ejemplo, la autoevaluación del individuo sobre su estado de salud después de la administración.

[0057] El éxito de la administración de las células no se basa, en ciertas modalidades,
15 en la supervivencia en el individuo de las PDACs estimuladas administradas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β . El éxito, en cambio, se basa en una o más métricas de mejora en la salud cardíaca o circulatoria, como se indica anteriormente. Por lo tanto, las células no necesitan integrarse y latir con el corazón del paciente o con los vasos sanguíneos.

[0058] La administración de PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con
20 IL-1 β , o composiciones terapéuticas que comprenden tales células, a un individuo que lo necesita, puede lograrse, por ejemplo, mediante trasplante, implante (por ejemplo, de las propias células o las células como parte de una combinación de matriz y célula), inyección (ej., directamente al sitio de la enfermedad o condición, por ejemplo,
25 directamente a un sitio isquémico en el corazón de un individuo que ha tenido un infarto de miocardio), infusión, administración por catéter, o cualquier otro medio conocido en la técnica para proporcionar terapia celular.

[0059] En una modalidad, las composiciones de células terapéuticas se proporcionan a
un individuo que lo necesita, por ejemplo, mediante inyección en uno o más sitios en el
30 individuo. En una modalidad específica, las composiciones de células terapéuticas se proporcionan mediante inyección intracardíaca, por ejemplo, en un área isquémica en

el corazón. En otras modalidades específicas, las células se inyectan en la superficie del corazón, en un área adyacente, o incluso en un área más remota. En modalidades preferidas, las células pueden albergar el área enferma o lesionada.

[0060] Un individuo que tiene una enfermedad o afección del sistema coronario o

5 vascular puede recibir PDACs estimuladas en cualquier momento en que las células sean terapéuticamente beneficiosas. En ciertas modalidades, por ejemplo, las PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o composiciones terapéuticas de la invención se administran en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 10 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días del infarto de miocardio. La administración proximal en el tiempo a un infarto de miocardio, por ejemplo, dentro de 1-3 o 1-7 días, es preferible a la administración distal en el tiempo, por ejemplo, después de 3 o 7 días después de un infarto de miocardio. En otras modalidades, las células o composiciones terapéuticas de la invención se administran en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días de diagnóstico inicial de la enfermedad o condición.

[0061] También se proporcionan en este documento kits para uso en el tratamiento del

infarto de miocardio. Los kits proporcionan una composición celular terapéutica que 20 comprende PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , que se pueden preparar en una forma farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, mezclando con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un aplicador, junto con instrucciones de uso. Idealmente, el kit puede usarse en el campo, por ejemplo, en un consultorio médico o por un proveedor de atención de emergencia para aplicarse a un paciente 25 diagnosticado con un infarto de miocardio o un evento cardíaco similar.

[0062] En modalidades específicas de los métodos de tratamiento proporcionados en este documento, las PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β se administran con células madre (es decir, células madre que no son PDAC), mioblastos, miocitos, cardiomioblastos, cardiomiocitos o progenitores de mioblastos, 30 miocitos, cardiomioblastos y/o cardiomiocitos.

[0063] En una modalidad específica, los métodos de tratamiento proporcionados en la presente comprenden administrar PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , por ejemplo, una composición terapéutica que comprende las células estimuladas, a un paciente con una enfermedad cardíaca o del sistema circulatorio; y evaluar al paciente por mejoras en la función cardíaca, en donde la composición celular terapéutica se administra como un complejo matriz-células. En ciertas modalidades, la matriz es un andamio, preferiblemente bioabsorbible, que comprende al menos las células.

[0064] Las PDACs estimuladas, por ejemplo, las PDACs estimuladas con IL-1 β y las poblaciones de tales células, se pueden proporcionar de forma terapéutica o profiláctica a un individuo, por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección que afecta el corazón o el sistema circulatorio. Dichas enfermedades, trastornos o afecciones pueden incluir insuficiencia cardíaca congestiva debida a aterosclerosis, cardiomiopatía o lesión cardíaca, por ejemplo, una lesión isquémica, tal como por infarto de miocardio o lesión (aguda o crónica).

[0065] En ciertas modalidades, al individuo se le administra una cantidad terapéuticamente efectiva de PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , por ejemplo, en una población de células estimuladas que comprenden las PDACs. En una modalidad específica, la población comprende aproximadamente 50% de PDACs estimuladas. En otra modalidad específica, la población es una población sustancialmente homogénea de PDACs estimuladas. En otras modalidades, la población comprende al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de PDACs estimuladas.

[0066] las PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β se pueden administrar a un individuo en forma de una composición terapéutica que comprende las células y otro agente terapéutico, tal como el factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleucina 18 (IL-18), un agente antitrombogénico (ej., heparina, derivados de heparina, uroquinasa o PPACK

(dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), un compuesto de antitrombina, un antagonista del receptor de plaquetas, un anticuerpo anti-trombina, un anticuerpo del receptor anti-plaquetario, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, un inhibidor de prostaglandinas, y/o un inhibidor de plaquetas), un agente antiapoptótico (por ejemplo, 5 eritropoyetina (Epo), un derivado o análogo de Epo, o sus sales, trombopoyetina (Tpo), IGF-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o un inhibidor de caspasa), un agente antiinflamatorio (ej., un inhibidor de p38 MAP quinasa, una estatina, en un inhibidor de IL-6, un inhibidor de IL-1, Pemirolast, Tranilast, Remicade, Sirolimus y/o un compuesto antiinflamatorio no esteroideo (por ejemplo, ácido acetilsalicílico, 10 ibuprofeno, Tepoxalina, tolmetina o suprofen), un agente inmunosupresor o inmunomodulador (por ejemplo, un inhibidor de calcineurina, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus, un inhibidor de mTOR tal como Sirolimus o everolimus; un antiproliferativo tal como azatioprina y/o micofenolato mofetilo; un corticosteroide, por ejemplo, prednisolona o hidrocortisona; un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal del 15 receptor anti-IL-2R α , Basiliximab, Daclizuma, anticuerpos policlonales anti-células T tales como globulina antitimocítica (ATG), globulina anti-linfocito (ALG), y/o anticuerpo OKT3 monoclonal anti-células T, o células madre placentarias adherentes como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 7.468.276, y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2007/0275362, las divulgaciones de cada una de las 20 cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad), y/o antioxidante (por ejemplo, probucol, vitaminas A, C y/o E, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína, o un derivado antioxidante, análogo o sal de cualquiera de los anteriores). En ciertas modalidades, las composiciones terapéuticas que comprenden las PDACs comprenden además uno o más tipos de células adicionales, por ejemplo, 25 células adultas (por ejemplo, fibroblastos o células endodérmicas), células madre y/o células progenitoras. Dichos agentes terapéuticos y/o uno o más tipos adicionales de células se pueden administrar a un individuo que lo necesite individualmente o en combinaciones o dos o más de tales compuestos o agentes.

[0067] En ciertas modalidades, el individuo a tratar es un mamífero. En una modalidad 30 específica, el individuo a tratar es un ser humano. En modalidades específicas, el

individuo es un animal de granja o un animal doméstico. En otras modalidades específicas, el individuo a tratar es un caballo, oveja, vaca o buey, cerdo, perro o gato.

5.1.2 Tratamiento de la Enfermedad Isquémica

[0068] En ciertas modalidades, se proporciona un método para tratar un individuo que tiene una interrupción del flujo sanguíneo, por ejemplo, en la vasculatura periférica, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β . En ciertas modalidades específicas, la isquemia es enfermedad arterial periférica (PAD), por ejemplo, isquemia crítica de extremidades (CLI). En ciertas otras modalidades, la isquemia es enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad arterial periférica, enfermedad vascular isquémica, enfermedad cardíaca isquémica o enfermedad renal isquémica.

[0069] En una modalidad específica, dicha interrupción del flujo de sangre es isquemia crítica de las extremidades. En otra modalidad más específica, dicha CLI es un bloqueo severo en las arterias de las extremidades inferiores, lo cual reduce

marcadamente el flujo sanguíneo. En otra modalidad más específica, dicho CLI se caracteriza por dolor isquémico en reposo, dolor severo en las piernas y los pies mientras el individuo no se mueve, llagas no curativas en los pies o las piernas, dolor o entumecimiento en los pies, piel brillante, lisa, seca de las piernas o los pies,

engrosamiento de las uñas de los pies, pulso ausente o disminuido en las piernas o los pies, llagas abiertas, infecciones de la piel o úlceras que no cicatrizan, y/o gangrena seca (piel seca y negra) de las piernas o los pies. En otra modalidad específica, el individuo que tiene CLI ha experimentado la pérdida de al menos un dígito y/o

extremidad completa. En otra modalidad específica del método, dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β que da como resultado la eliminación de una mejora detectable en la disminución de la gravedad o la desaceleración de la progresión. de uno o más síntomas de, pérdida de la función de la extremidad y/o privación de oxígeno

(hipoxia/anoxia) atribuible a una interrupción del flujo de sangre en la vasculatura

periférica del individuo. En otra modalidad específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de PDACs estimuladas aisladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β se administra a dicho individuo profilácticamente, por ejemplo, para reducir o eliminar el

daño tisular causado por una segunda o posterior interrupción del flujo de sangre en o alrededor de la extremidad después de dicha interrupción del flujo de sangre.

[0070] En otras modalidades, las PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β pueden usarse en el tratamiento de accidente cerebrovascular, por ejemplo,

5 accidente cerebrovascular isquémico, por ejemplo, tratamiento del accidente cerebrovascular mediante promoción de la angiogénesis en un área isquémica del SNC. En un aspecto, se proporciona un método para tratar un individuo que tiene una interrupción del flujo de sangre en el cerebro del individuo o alrededor de él, por ejemplo, que tiene un síntoma o un déficit neurológico atribuible a una interrupción del
10 flujo de sangre en o alrededor el cerebro o el sistema nervioso central (SNC) del individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células placentarias humanas adherentes al plástico de cultivo celular aislado, en donde dichas células placentarias aisladas tienen características de células multipotentes o células madre. En ciertas modalidades, la interrupción del flujo de
15 sangre da como resultado una lesión anóxica o una lesión hipóxica en el cerebro o el SNC del individuo. Como se contempla en este documento, el tratamiento de un síntoma o déficit neurológico en un individuo atribuible a una interrupción del flujo de sangre en el cerebro del individuo o alrededor de éste incluye el tratamiento de síntomas o déficits neurológicos atribuibles a la lesión por reperfusión que pueden
20 acompañar a tal interrupción del flujo de sangre en o alrededor del cerebro del individuo.

[0071] Además de ser angiogénicas, las células placentarias estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , como se describe a continuación) proporcionadas en este documento son neuroprotectoras. En ciertas modalidades, las células placentarias
25 estimuladas son neuroprotectoras en un entorno con poco oxígeno, por ejemplo, en condiciones hipóxicas (por ejemplo, menos de aproximadamente 5% de O₂). En ciertas modalidades, las células madre placentarias estimuladas, cuando entran en contacto con neuronas u otras células neuronales, o astrocitos, aumentan la salud de las neuronas, células nerviosas o astrocitos, por ejemplo, como se ve por un aumento en la
30 longitud de neuritas in vitro en una co -cultivo de PDACs y neuronas. En ciertas otras modalidades, las PDACs, por ejemplo, las PDACs estimuladas con IL-1 β reducen la

concentración de una o más especies reactivas de oxígeno en un entorno hipóxico. Además, en ciertas modalidades, las células placentarias estimuladas (por ejemplo, PDACs) secretan una o más de las citocinas neurotróficas BDNF, VEGF, HGF, G-CSF, factor de crecimiento nervioso (NGF) y/o neurotrofina-3 (NTF3). Como tales, las PDACs, por ejemplo, las PDACs estimuladas por IL-1 β son útiles en el tratamiento de la lesión isquémica, tanto para el SNC como para el SNP, por ejemplo, lesión isquémica del sistema nervioso en el SNC como consecuencia de un accidente cerebrovascular o lesión isquémica al sistema nervioso en el SNP como resultado de isquemia crítica de las extremidades o enfermedad vascular periférica. En otras modalidades, las PDACs, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β pueden usarse para tratar, por ejemplo, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y/o neuropatías periféricas, por ejemplo, neuropatía diabética.

5.1.3 Tratamiento de la Úlcera del Pie Diabético

[0072] Se proporcionan en este documento los métodos para tratar la úlcera del pie diabético (DFU) en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β . En una modalidad específica, dichas PDACs estimuladas se formulan como una composición farmacéutica.

[0073] En una modalidad específica, un sujeto con DFU tratada de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente, tiene diabetes tipo I. En otra modalidad específica, un sujeto con DFU tratada de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente, tiene diabetes tipo II. En ciertas modalidades, un sujeto tratado de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento tiene más de una DFU, por ejemplo, el sujeto tiene más de una DFU en un solo pie, o al menos una DFU en cada pie. En una modalidad específica, el sujeto tiene una o más DFU en la parte inferior de un pie, o ambos pies.

[0074] En ciertas modalidades, un sujeto con DFU tratado de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente tiene neuropatía periférica, por ejemplo, daño a uno o más de los nervios en las piernas y/o los pies.

[0075] En ciertas modalidades, un sujeto con DFU tratada de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente tiene DFU con una afección que causa una interrupción en el flujo de sangre en la vasculatura periférica del sujeto. En una modalidad específica, el sujeto tiene enfermedad arterial periférica (PAD). En ciertas

5 modalidades, dicha DFU es causada por y/o está asociada con PAD.

[0076] En ciertas modalidades, los métodos para tratar la DFU proporcionados en la presente dan como resultado una mejora detectable de uno o más síntomas de DFU en un sujeto tratado de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento. Los síntomas de ejemplo de DFU incluyen, sin limitación, llagas, úlceras o ampollas en el

10 pie y/o la parte inferior de la pierna; dolor en el pie (o los pies) y/o la parte inferior de la pierna; dificultad para caminar; decoloración en el pie (o pies), por ejemplo, el pie (o los pies) aparecen en negro, azul y/o rojo; y signos de infección (por ejemplo, fiebre, enrojecimiento de la piel y/o hinchazón).

[0077] En ciertas modalidades, los métodos para tratar la DFU proporcionados en la presente comprenden administrar PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β - o una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β -) a un sujeto que tiene DFU en una cantidad y durante un tiempo suficiente para una mejora detectable en uno o más indicios de mejora, en donde dichos indicios de mejora incluyen (i) reducción en el tamaño de la úlcera; (ii) cierre de

15 la úlcera: cierre de la piel de una o más úlceras sin drenaje o la necesidad de apósito; (iii) retención del cierre de la úlcera durante un período de tiempo específico después del cierre, por ejemplo, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o 6 semanas después del cierre; (iv) tiempo para el cierre de la úlcera; (v) mejora en el índice braquial de tobillo (ABI), una prueba que mide la presión sanguínea en el tobillo y en el

20 brazo mientras el sujeto está en reposo y luego se repite mientras el sujeto está en movimiento (ej., caminando sobre una cinta rodante). que puede usarse para predecir/evaluar la severidad de PAD; (vi) mejora en el índice braquial del dedo del pie (LCT), una prueba análoga a ABI que utiliza la presión sanguínea del dedo del pie frente a la presión arterial del tobillo; (vii) mejora en el oxígeno transcutáneo, es decir,

25 el nivel de oxígeno en el tejido debajo de la piel cerca de la úlcera (véase, por ejemplo, Ruangsetakit y col., J Wound Care, 2010, 19 (5): 202-6); (viii) mejora en el registro del

30

volumen del pulso, que es una prueba vascular no invasiva en la que se utilizan los manguitos de presión sanguínea y un dispositivo de ultrasonido manual para obtener información sobre el flujo sanguíneo arterial en los brazos y las piernas; (ix) tiempo hasta la amputación mayor, por ejemplo, amputación por encima del tobillo; (x) mejora en la escala de Clasificación de Wagner, que evalúa la profundidad de la úlcera y la presencia de osteomielitis o gangrena mediante un sistema de clasificación: grado 0 (lesión pre o post ulcerativa), grado 1 (úlceras de espesor parcial/completo), grado 2 (examen del tendón o cápsula), grado 3 (profundo con osteítis), grado 4 (gangrena parcial del pie) y grado 5 (gangrena completa del pie); (xi) mejoría en los criterios de Rutherford, que se usa para la estadificación de la enfermedad arterial periférica, tiene siete etapas de clasificación: Etapa 0 - Asintomática, Etapa 1 - Claudicación leve, Etapa 2 - Claudicación moderada, Etapa 3 - Claudicación grave, Etapa 4 - Dolor en reposo, Etapa 5 - Ulceración isquémica que no excede la úlcera de los dedos del pie y Etapa 6 - úlceras isquémicas graves o gangrena franca; y (xii) mejora en el puntaje de dolor en reposo de la pierna, una escala de dolor de 0-10 con 0 sin dolor y 10 que representa dolor máximo.

[0078] En ciertas modalidades, los métodos para tratar DFU proporcionados en la presente comprenden administrar PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β) a un sujeto que tiene DFU en una cantidad y durante un tiempo suficiente para mejora detectable en la calidad de vida del sujeto según se evalúa por, por ejemplo, (i) una Encuesta de Salud de Forma Abreviada de 36 ítems (SF-36) (véase, por ejemplo, Ware, Medical Care 30 (6): 473- 483); (ii) la Forma Corta de Escala de Úlcera del Pie Diabético (DFS-SF), que mide el impacto de la úlcera del pie diabético en la calidad de vida (ver, por ejemplo, Bann, Pharmacoeconomics, 2003, 21 (17): 1277-90); (iii) la Impresión Global del Paciente de Escala de Cambio, para evaluar los cambios en neuropatía en el tiempo (véase, por ejemplo, Kamper y col., J. Man. Manip. Ther., 2009, 17 (3): 163-170); y/o (iv) la Escala EuroQol5D (EQ-5D TM), que es un cuestionario de salud utilizado para obtener un perfil descriptivo y un valor de índice único para el estado de salud de un paciente.

[0079] En una modalidad específica de los métodos de tratamiento de DFU descritos en este documento, las PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β) se administran mediante inyección. En otra modalidad específica de los métodos de

5 tratamiento de DFU descritos en este documento, las PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β) se administran a un sujeto que se trata mediante implantación en dicho sujeto de una matriz o andamio que comprende células placentarias.

[0080] En una modalidad específica de los métodos de tratamiento de DFU descritos en

10 este documento, las PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β) se administran por vía intramuscular. En una modalidad específica de los métodos de tratamiento de DFU descritos en este documento, las PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición farmacéutica que comprende PDACs

15 estimuladas con IL-1 β) se administran por vía intravenosa. En otra modalidad específica de los métodos de tratamiento de DFU descritos en este documento, las PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β) se administran por vía subcutánea. En una modalidad específica de los métodos de tratamiento de DFU

20 descritos en este documento, las PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β) se administran de manera local. En una modalidad específica de los métodos de tratamiento de DFU descritos en este documento, las PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición

25 farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β) se administran de manera sistémica. En ciertas modalidades, los métodos de tratamiento de DFU descritos en este documento comprenden administración de aproximadamente 1×10^6 , 3×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 3×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 3×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , o 1×10^{10} PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición

30 farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β). En ciertas modalidades, los métodos de tratamiento de DFU descritos en este documento comprenden la

administración de aproximadamente 1×10^6 a 3×10^6 , 3×10^6 a 5×10^6 , 5×10^6 a 1×10^7 , 1×10^7 a 3×10^7 , 3×10^7 a 5×10^7 , 5×10^7 a 1×10^8 , 1×10^8 a 3×10^8 , 3×10^8 a 5×10^8 , 5×10^8 a 1×10^9 , 1×10^9 a 5×10^9 , o 5×10^9 a 1×10^{10} de PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición farmacéutica que comprende PDACs

5 estimuladas con IL-1 β). En una modalidad específica, los métodos de tratamiento de DFU descritos en este documento comprenden la administración de aproximadamente 3×10^6 de PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β). En otra modalidad específica, los métodos de tratamiento de DFU descritos en este documento comprenden la administración de aproximadamente 1×10^7 de PDACs estimuladas (por
10 ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β). En otra modalidad específica, los métodos de tratamiento de DFU descritos en este documento comprenden la administración de aproximadamente 3×10^7 de PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β).

[0081] En una modalidad específica de los métodos de tratamiento de DFU descritos en
15 la presente, las PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β) se administran intramuscularmente con una semana entre administraciones, por ejemplo, PDACs estimuladas se administran el día 1 (el primer día de administración) y una
segunda dosis de PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β o
20 una composición farmacéutica que comprende PDACs estimuladas con IL-1 β) se administra una semana más tarde (es decir, día 8). En otra modalidad específica, los métodos comprenden la administración de aproximadamente 3×10^6 PDACs
estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β) en cada día de
administración (es decir, los días 1 y 8). En otra modalidad específica, los métodos
25 comprenden la administración de aproximadamente 1×10^7 PDACs estimuladas (por
ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β) en cada día de administración (es decir, los
días 1 y 8). En otra modalidad específica, los métodos comprenden la administración
de aproximadamente 1×10^7 PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas con
IL-1 β) en cada día de administración (es decir, los días 3 y 8). En otra modalidad
30 específica, el sujeto al que se administran las PDACs estimuladas (por ejemplo, PDACs
estimuladas con IL-1 β) tiene PAD.

5.2 CÉLULAS PLACENTARIAS AISLADAS Y POBLACIONES AISLADAS DE CÉLULAS PLACENTARIAS

[0082] Las células placentarias que sirven como base para la generación de PDACs estimuladas, por ejemplo PDACs estimuladas con IL-1 β , son células que pueden obtenerse de una placenta o parte de la misma, que se adhieren a un sustrato de cultivo tisular y tienen características de células multipotentes o células madre, pero no son trofoblastos. Esta Sección (5.2) describe las células placentarias que representan la fuente de células que pueden usarse para generar PDACs estimuladas, por ejemplo, PDAC estimuladas con IL-1 β .

[0083] Las células placentarias que sirven como base para la generación de PDACs estimuladas pueden ser de origen fetal o materno (es decir, pueden tener el genotipo del feto o la madre, respectivamente). Preferiblemente, las células placentarias y las poblaciones de las mismas son de origen fetal. Como se usa en el presente documento, la frase "de origen fetal" o "de origen no materno" indica que las células placentarias aisladas o poblaciones de células placentarias aisladas se obtienen del cordón umbilical o estructuras placentarias asociadas con el feto, es decir, que tienen el genotipo fetal. Como se usa en el presente documento, la frase "origen materno" indica que las células o poblaciones de células se obtienen a partir de estructuras placentarias asociadas con la madre, por ejemplo, que tienen el genotipo materno. Las células placentarias aisladas o las poblaciones de células que comprenden las células placentarias aisladas, pueden comprender células placentarias aisladas que son únicamente de origen fetal o materno, o pueden comprender una población mixta de células placentarias aisladas tanto de origen fetal como materno. Las células placentarias aisladas, y las poblaciones de células que comprenden las células placentarias aisladas estimuladas, pueden identificarse y seleccionarse por las características morfológicas, de marcador y de cultivo que se describen a continuación. En ciertas modalidades, cualquiera de las células placentarias, por ejemplo, células madre placentarias o células multipotentes placentarias descritas en la presente, son autólogas a un receptor, por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio. En ciertas otras modalidades, cualquiera de las células placentarias, por ejemplo, células madre placentarias o células multipotentes

placentarias descritas en la presente, son autólogas a un receptor, por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio.

[0084] En ciertas modalidades, las células madre placentarias descritas en este documento que sirven como base para la generación de PDACs estimuladas (por ejemplo, las PDACs descritas en las Secciones 5.2.1, 5.2.2 y 5.2.3, más adelante) se estimulan con una o más pro-citoquinas inflamatorias. En ciertas modalidades, las células madre placentarias descritas en este documento que sirven como base para la generación de PDACs estimuladas (por ejemplo, las PDACs descritas en las Secciones 5.2.1, 5.2.2 y 5.2.3, más adelante) se han estimulado con una o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , o INF- γ . En una modalidad específica, las células madre placentarias descritas en este documento que sirven como base para la generación de PDACs estimuladas (por ejemplo, las PDACs descritas en las Secciones 5.2.1, 5.2.2 y 5.2.3, Infra) se han estimulado con IL-1 β .

5.2.1 Características Físicas y Morfológicas

[0085] Las células placentarias aisladas utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato del cultivo tisular, por ejemplo, superficie del recipiente de cultivo tisular (por ejemplo, plástico de cultivo tisular) o a una superficie de cultivo tisular recubierta con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina y proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL® (BD Discovery Labware, Bedford, MA)). Las células placentarias aisladas utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente suponen un aspecto fibroblastoideo, estrellado generalmente en cultivo, con una serie de procesos citoplásmicos que se extienden desde el cuerpo celular central. Sin embargo, las células son morfológicamente distinguibles de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que las células placentarias aisladas exhiben un mayor número de éstos procesos que los fibroblastos. Morfológicamente, las células placentarias aisladas utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente también se distinguen de las células madre hematopoyéticas, que generalmente adoptan una morfología más redondeada o adoquinada en cultivo.

[0086] En ciertas modalidades, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, cuando se cultivan en un medio de crecimiento, desarrollan cuerpos de tipo embrioide. Los cuerpos tipo embrioide son grupos no contiguos de células que pueden crecer encima de una capa adherente de células placentarias aisladas en proliferación. El término "tipo embrioide" se usa porque los grupos de células se parecen a los cuerpos embrioides, grupos de células que crecen a partir de cultivos de células madre embrionarias. El medio de crecimiento en el que pueden desarrollarse cuerpos de tipo embrioide en un cultivo proliferante de células placentarias aisladas incluye un medio que comprende, por ejemplo, DMEM-LG (por ejemplo, de Gibco); suero de ternera fetal al 2% (por ejemplo, de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); albúmina sérica bovina de ácido linoleico (LA-BSA); Dexametasona 10^{-9} M (por ejemplo, de Sigma); 2 - fosfato del ácido ascórbico 10^{-4} M (ej., de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (ej., de R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (por ejemplo, de R&D Systems).

5.2.2 Marcadores de Superficie Celular, Moleculares y Genéticos

[0087] Las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son células placentarias humanas adherentes al plástico de cultivo tisular que tienen características de células multipotentes o células madre, y expresan una pluralidad de marcadores que pueden usarse para identificar y/o aislar las células. o poblaciones de células que comprenden las células madre. En ciertas modalidades, las células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son angiogénicas, por ejemplo, in vitro o in vivo. Las células placentarias aisladas y las poblaciones de células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento incluyen células placentarias y poblaciones celulares que contienen células placentarias obtenidas directamente de la placenta, o cualquier parte de la misma (por ejemplo, corion, cotiledones placentarios o similares). Las poblaciones de células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento también incluyen poblaciones de (es decir, dos o más) células placentarias aisladas en cultivo, y una población en un contenedor, por ejemplo, una bolsa. Las células placentarias

utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento no son células mesenquimatosas derivadas de médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo o células mesenquimáticas obtenidas de sangre de cordón umbilical, sangre de placenta o sangre periférica. Las células placentarias, por ejemplo, células placentarias multipotentes y placentarias, usadas para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente y, por ejemplo, en las patentes estadounidenses No. 7.311.904; 7.311.905; y 7,468,276; y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2007/0275362, cuyas descripciones se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

[0088] En otras de éstas modalidades, las células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son células placentarias multipotentes aisladas. En una modalidad, dichas células, por ejemplo, las células usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento, son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ tal como se detectan por citometría de flujo. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ utilizadas para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo neural, células de un fenotipo osteogénico y/o células de un fenotipo condrogénico. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son adicionalmente CD200⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son adicionalmente CD45⁻ o CD90⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son adicionalmente CD45⁻ o CD90⁺ como se detecta mediante citometría de flujo. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son adicionalmente CD90⁺ o CD45⁻, como se detecta mediante citometría de flujo. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son adicionalmente CD90⁺ y CD45⁻,

detectadas por citometría de flujo, es decir, las células son CD34⁻, CD10⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺. En otra modalidad específica, dichas células CD34⁻, CD10⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente CD80⁻ y CD86⁻.. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento han sido estimuladas por una o más citoquinas. En una modalidad específica, dicha citoquina es una citoquina proinflamatoria. En otra modalidad específica, dicha citoquina es IL-1β.

[0089] En ciertas modalidades, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y una o más de CD38⁻, CD45⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD133⁻, HLA-DR,DP,DQ⁻, SSEA3⁻, SSEA4⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, HLA-A,B,C⁺, PDL1⁺, ABC-p⁺, y/o OCT-4⁺, como se detecta por citometría de flujo. En otras modalidades, cualquiera de las células placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son adicionalmente una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺. En otra modalidad específica, las células son adicionalmente CD44⁺. En otra modalidad específica de cualquiera de las células placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas anteriores, las células son adicionalmente una o más de CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, o Ligando de muerte programada (PDL1)⁺, o cualquier combinación de los mismos. En otra modalidad específica, las células madre placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento han sido estimuladas por una o más citoquinas. En una modalidad específica, dicha citoquina es una citoquina proinflamatoria. En otra modalidad específica, dicha citoquina es IL-1β.

[0090] En otra modalidad, las células placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son adicionalmente una o más de CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{baja}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, HLA-G⁻, o Ligando de muerte programada 1 (PDL1)⁺, o cualquier combinación de los mismos. En otra modalidad, las células placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ usadas para generar

las PDACs estimuladas descritas en este documento son adicionalmente CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{baja}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻,
5 SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, y Ligando de muerte programada 1 (PDL1)⁺.

[0091] En otra modalidad específica, cualquiera de las células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son adicionalmente ABC-p⁺, como se detecta mediante citometría de flujo, u OCT-4⁺ (POU5F1⁺), según se
10 determina por RT-PCR, en donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica a la placenta (también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)) y OCT-4 es la proteína Octamer4 (POU5F1). En otra modalidad específica, cualquiera de las células placentarias usadas para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente son
15 adicionalmente SSEA3 o SSEA4, según se determina mediante citometría de flujo, en donde SSEA3 es Antígeno Embrionario 3 Específico a Etapa, y SSEA4 es Antígeno Embrionario 4 Específico a Etapa. En otra modalidad específica, cualquiera de las células placentarias utilizadas para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente son, además, SSEA3⁻ y SSEA4⁻.

[0092] En otra modalidad específica, cualquiera de las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son adicionalmente una o más de MHC-I⁺ (por ejemplo, HLA-A, B, C⁺), MHC-II- (por ejemplo, HLA-DP, DQ, DR⁻) o HLA-G⁻. En otra modalidad específica, cualquiera de las células madre placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas
25 descritas en la presente son adicionalmente una o más de MHC-I⁺ (por ejemplo, HLA-A, B, C⁺), MHC-II- (por ejemplo, HLA-DP, DQ, DR⁻) y HLA-G⁻.

[0093] También se proporcionan en la presente poblaciones de las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, o poblaciones de células, por ejemplo, poblaciones de células placentarias, que
30 comprenden, por ejemplo, células madre placentarias que están enriquecidas para las células placentarias aisladas que son útiles en los métodos y composiciones descritos

en este documento. Las poblaciones preferidas de células que comprenden las células
 placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la
 presente, en donde las poblaciones de células comprenden, por ejemplo, al menos
 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,
 5 85%, 85%, 90%, 95% o 98% de células placentarias aisladas CD10⁺, CD105⁺ y CD34⁻
 ; es decir, al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%,
 65%, 70%, 75%, 80%, El 85%, 90%, 95% o 98% de las células en dicha población son
 células placentarias aisladas CD10⁺, CD105⁺ y CD34⁻. En particular, las células
 placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD200⁺. En otra
 10 modalidad específica, las células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺,
 CD200⁺ son adicionalmente CD90⁺ o CD45⁻, como se detecta mediante citometría de
 flujo. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺,
 CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente CD90⁺ y CD45⁻, como se detecta mediante
 citometría de flujo. En otra modalidad específica, cualquiera de las células placentarias
 15 aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ descritas anteriormente son adicionalmente una o
 más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺. En otra modalidad específica, las
 células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ utilizadas para generar las
 PDACs estimuladas descritas en la presente, o las células placentarias aisladas CD34⁻,
 CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la
 20 presente, son adicionalmente CD44⁺. En una modalidad específica de cualquiera de
 las poblaciones de células que comprenden las células placentarias aisladas CD34⁻,
 CD10⁺, CD105⁺ anteriores, las células placentarias 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⁺),
 25 CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{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 cualquier combinación de los
 mismos. En otra modalidad específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ usadas
 para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son adicionalmente
 30 CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻,
 CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺),

CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina ^{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)⁺.

[0094] En ciertas modalidades, las células placentarias aisladas usadas para generar

- 5 las PDACs estimuladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son una o más, o todas entre CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, y ABC-p⁺, en donde dichas células placentarias aisladas se obtienen por disrupción física y/o enzimática del tejido placentario. En una modalidad específica, las células placentarias aisladas son OCT-4⁺
- 10 y ABC-p⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺ y CD34⁻, en donde dichas células placentarias aisladas tienen al menos una de las siguientes características: CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para
- 15 generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las
- 20 PDACs estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺ y CD34⁻, y es cualquiera SH2⁺ o SH3⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺, CD34⁻, SH2⁺, y SH3⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺, CD34⁻,
- 25 SSEA3⁻ y SSEA4⁻, y son SH2⁺ o SH3⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺ y CD34⁻, y SH2⁺ o SH3⁺, y es al menos una de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻, o SSEA4⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs
- 30 estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻ y SH2⁺ o SH3⁺.

- [0095]** En otra modalidad, el tallo placentario aislado usado para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺,
5 CD34⁻, CD45⁻, SSEA3⁻, o SSEA4⁻. En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, OCT-4⁺, CD34⁻ o CD45⁻.
- 10 **[0096]** En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, y SH4⁺; en donde dichas células placentarias aisladas son adicionalmente una o más de OCT-4⁺, SSEA3⁻ o SSEA4⁻.
- 15 **[0097]** En ciertas modalidades, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento son CD200⁺ o HLA-G⁻. En una modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD200⁺ y HLA-G⁻. En otra modalidad
20 específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son adicionalmente CD73⁺ y CD105⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para
25 generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD200⁺ o HLA-G⁻ facilitan la formación de cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende las células
30 placentarias aisladas, en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para

generar las PDACs estimuladas descritas en la presente se aíslan de las células placentarias que no son células madre o multipotentes. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas se aíslan lejos de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

- 5 **[0098]** En otra modalidad, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en este documento es una población de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida para células madre CD200⁺, HLA-G⁻. En una modalidad específica, dicha población es una población de células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento. En diversas
- 10 modalidades, 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 células placentarias aisladas CD200⁺, HLA-G⁻. Preferiblemente, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población celular son células
- 15 placentarias aisladas CD200⁺, HLA-G⁻. Más preferiblemente, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de dichas células son células placentarias aisladas CD200⁺, HLA-G⁻. En una modalidad específica de las poblaciones celulares, dichas células aisladas placentarias CD200⁺, HLA-G⁻ también son CD73⁺ y CD105⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD200⁺, HLA-G⁻ también
- 20 son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD200⁺, HLA-G⁻ también son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otra modalidad, dicha población de células produce uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra modalidad específica, dicha población celular está aislada de
- 25 las células placentarias que no son células madre. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD200⁺, HLA-G⁻ se aíslan de células placentarias que no muestran estos marcadores.

- [0099]** En otra modalidad, las células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son CD73⁺, CD105⁺ y CD200⁺. En otra
- 30 modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son HLA-G⁻. En otra modalidad específica,

las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, y HLA-G⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ y CD200⁺ usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende las células placentarias aisladas, cuando la población se cultiva bajo condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrioide. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente se aíslan lejos de las células placentarias que no son las células placentarias aisladas. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente se aíslan de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

[00100] En otra modalidad, una población celular utilizada para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente es una población de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida para células placentarias CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas. En diversas modalidades, 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 células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺. En otra modalidad, al menos aproximadamente 70% de dichas células en dicha población de células son células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺. En otra modalidad, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺. En una modalidad específica de dichas poblaciones, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son HLA-G⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las

PDACs estimuladas descritas en este documento son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, y HLA-G⁻. En otra modalidad específica, dicha población de células produce uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra modalidad específica, dicha población de células placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otra modalidad específica, dicha población de células placentarias se aísla de las células placentarias que no presentan estas características.

[00101] En ciertas otras modalidades, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, HLA-G⁻ o ABC-p⁺. En una modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, y OCT-4⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, y SH4⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, HLA-G⁻, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺ y ABC-p⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las

PDACs estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En una modalidad específica, dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻ utilizadas para generar las PDACs estimuladas que se describen en este documento son, además, CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻,
5 CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, y SH4⁺. En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son OCT-4⁺ y CD34⁻, y SH3⁺ o SH4⁺. En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD34⁻ y CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺ u OCT-4⁺.

10 **[00102]** En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son CD200⁺ y OCT-4⁺. En una modalidad específica, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son CD73⁺ y CD105⁺. En otra modalidad
15 específica, dichas células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento son HLA-G⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias
20 aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ facilitan la producción de uno o más cuerpos de tipo embrioide por una población de células placentarias que comprende las células aisladas, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrioide. En otra modalidad
25 específica, dichas células placentarias aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ se aíslan de células placentarias que no son células madre. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ se aíslan de las células placentarias que no presentan estas características.

30 **[00103]** En otra modalidad, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente es una población de células usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que comprende, por ejemplo,

que está enriquecida para células placentarias CD200⁺, OCT-4⁺. En diversas modalidades, 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 células placentarias aisladas CD200⁺, OCT-4⁺. En otra modalidad, al menos aproximadamente el 70% de dichas células son dichas células aisladas placentarias CD200⁺, OCT-4⁺. En otra modalidad, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99% de las células en dicha población celular son dichas células placentarias aisladas CD200⁺, OCT-4⁺. En una modalidad específica de las poblaciones aisladas, dichas células placentarias aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son adicionalmente CD73⁺ y CD105⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son adicionalmente HLA-G⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD200⁺, OCT-4⁺ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células aisladas placentarias CD200⁺, OCT-4⁺ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻. En otra modalidad específica, la 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 modalidad específica, dicha población celular está aislada de células placentarias que no están aisladas de células placentarias CD200⁺, OCT-4⁺. En otra modalidad específica, dicha población celular está aislada de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

[00104] En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento son CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, las células placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son adicionalmente OCT-4⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son adicionalmente CD200⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ son

adicionalmente CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 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 células tipo embrioide. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ se aíslan de las células placentarias que no son las células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G se aíslan de células placentarias que no muestran estos marcadores.

5 **[00105]** En otra modalidad, una población celular utilizada para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente es una población de células que comprende, por ejemplo, una población que está enriquecida para células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G. En diversas modalidades, al menos aproximadamente 10%, al menos

15 aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60% de células en dicha población de células son células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻. En otra modalidad, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻. En

20 otra modalidad, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G. En una modalidad específica de las poblaciones anteriores, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G

25 son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G son adicionalmente OCT-4⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G aisladas son adicionalmente CD200⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻,

30 CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra modalidad específica, dicha población celular utilizada para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente se aísla de las

células placentarias que no son células placentarias CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻. En otra modalidad específica, dicha población celular utilizada para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente se aísla de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

5 **[00106]** En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento son CD73⁺ y CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias aisladas, que comprende dichas células CD73⁺, CD105⁺ cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ son adicionalmente OCT-4⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ son adicionalmente OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias CD73⁺, CD105⁺ aisladas se aíslan de las células placentarias que no son dichas células. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ se aíslan de las células placentarias que no presentan estas características.

20 **[00107]** En otra modalidad, una población celular utilizada para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente es una población de células que comprende, por ejemplo, una población que está enriquecida para células placentarias aisladas que son CD73⁺, CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias aisladas que comprenden dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En diversas modalidades, 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 en dicha población de células son células

placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺. En otra modalidad, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺. En otra modalidad, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son células placentarias aisladas CD73⁺,
5 CD105⁺. En una modalidad específica de las poblaciones anteriores, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ son adicionalmente OCT-4⁺. En otra modalidad
10 específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD200⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra modalidad específica, dicha población celular está aislada de células placentarias que no son células placentarias aisladas CD73⁺, CD105⁺. En otra modalidad específica,
15 dicha población celular está aislada de las células placentarias que no muestran estos marcadores.

[00108] En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son OCT-4⁺ y facilitan la formación de uno o
20 más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias aisladas que comprende dichas células cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En una modalidad específica, dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺ son adicionalmente CD73⁺ y CD105⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺ son adicionalmente
25 CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺ son adicionalmente CD200⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, y CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias OCT-4⁺ aisladas se aíslan de células placentarias que no son células placentarias
30 OCT-4⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺ se aíslan de células placentarias que no presentan estas características.

[00109] En otra modalidad, una población celular utilizada para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente es una población de células que comprende, por ejemplo, una población que está enriquecida para células placentarias aisladas que son OCT-4⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias aisladas que comprenden dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En diversas modalidades, 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 en dicha población de células son células placentarias aisladas OCT-4⁺. En otra modalidad, al menos aproximadamente 70% de las células en dicha población de células son dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺. En otra modalidad, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99% de las células en dicha población de células son células placentarias aisladas OCT-4⁺. En una modalidad específica de las poblaciones anteriores, dichas células placentarias OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺ son adicionalmente CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺ son adicionalmente CD73⁺ y CD105⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas OCT-4⁺ son adicionalmente CD200⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias OCT-4⁺ aisladas son adicionalmente CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, y CD45⁻. En otra modalidad específica, dicha población celular está aislada de células placentarias que no son dichas células. En otra modalidad específica, dicha población celular es aislada de las células placentarias que no presentan estos marcadores.

[00110] En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son células placentarias aisladas HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ y CD34⁻. En otra modalidad, una población celular utilizada para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos

y composiciones descritos en la presente es una población de células que comprende células placentarias aisladas, en la que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, en al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de las células en dicha población aislada de células son células placentarias aisladas HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ y CD34⁻. En una modalidad específica, dicha célula placentaria aislada o población de células placentarias aisladas se aísla de las células placentarias que no son células placentarias HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ y CD34⁻. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas son de origen no materno. En otra modalidad específica, dicha población aislada de células placentarias está sustancialmente libre de componentes maternos; por ejemplo, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población aislada de células placentarias son de origen no materno.

15 **[00111]** En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son células placentarias aisladas CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻. En otra modalidad, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente es una población de células

20 que comprende células placentarias aisladas, en la que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente el 99% de las células en dicha población de células están aisladas de células placentarias CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻. En una modalidad específica, dichas células placentarias

25 aisladas o población de células placentarias aisladas se aíslan de células placentarias que no son dichas células placentarias aisladas. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻ son de origen no materno, es decir, tienen el genotipo fetal. En otra modalidad específica, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%,

30 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población aislada de células placentarias son de origen no materno. En otra modalidad específica, dichas células

placentarias aisladas o población de células placentarias aisladas se aíslan de las células placentarias que no presentan estas características.

[00112] En otra modalidad, las células placentarias aisladas utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos

5 y composiciones descritos en la presente son células placentarias aisladas CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, y CD117⁻. En otra modalidad, una población celular útil para los métodos y composiciones descritos en la presente es una población de células que comprende, por ejemplo, una población enriquecida para células placentarias aisladas, en la que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos

10 aproximadamente 90%, al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 99% de las células en dicha población de células son células placentarias aisladas CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, y CD117⁻. En una modalidad específica, dicha célula placentaria aislada o población de células placentarias aisladas se aísla a partir de células placentarias que no son dichas células. En otra modalidad

15 específica, dichas células placentarias aisladas son de origen no materno. En otra modalidad específica, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población celular son de origen no materno. En otra modalidad específica, dicha célula placentaria aislada o población de células placentarias aisladas se aísla a partir de

20 células placentarias que no muestran estos marcadores.

[00113] En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y

composiciones descritos en este documento son células placentarias aisladas CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻. En otra modalidad, una población celular útil en los

25 métodos y composiciones descritos en la presente es una población de células que comprende, por ejemplo, una población enriquecida para células placentarias aisladas CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻, en las que 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

30 población son células placentarias CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻. En una modalidad específica, dichas células placentarias aisladas o población de células

placentarias aisladas se aíslan de las células placentarias que no son dichas células. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas son de origen no materno. En otra modalidad específica, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población celular son de origen no materno. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas o población de células placentarias aisladas se aíslan a partir de células placentarias que no presentan estas características.

[00114] En otra realización, las células placentarias aisladas usadas para generar los PDAC estimulados descritos en la presente memoria, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento son HLA A,B,C⁺, CD45⁻, CD34⁻, y CD133⁻, y son adicionalmente CD10⁺, CD13⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, y/o negativos para CD117. En otra modalidad, una población celular útil en los métodos descritos en la presente es una población de células que comprende células placentarias aisladas, en la que al menos aproximadamente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% aproximadamente de las células en dicha población son células placentarias aisladas que son HLA A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻, y que son adicionalmente positivas para CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200, y/o negativos para CD117 y/o HLA-G. En una modalidad específica, dichas células placentarias aisladas o población de células placentarias aisladas se aíslan a partir de células placentarias que no son dichas células. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas son de origen no materno. En otra modalidad específica, al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población celular son de origen no materno. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas o población de células placentarias aisladas se aíslan a partir de células placentarias que no muestran estos marcadores.

[00115] En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son células placentarias aisladas que son CD200⁺ y CD10⁺, según se determina mediante unión de anticuerpo, y CD117⁻, según lo determina tanto unión de anticuerpos como RT-PCR. En otra modalidad, las células

placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son células placentarias aisladas, por ejemplo, células madre placentarias o células multipotentes placentarias, que son CD10⁺, CD29⁻, CD54⁺, CD200⁺, HLA-G⁻, MHC clase I + y β-2-microglobulina⁺. En otra modalidad, las células placentarias aisladas

5 útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son células placentarias en las que la expresión de al menos un marcador celular es al menos dos veces mayor que para una célula madre mesenquimal (ej., una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea). En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas son de origen no materno. En otra modalidad específica, al menos aproximadamente
10 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de dichas células en dicha población celular son de origen no materno.

[00116] En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son células placentarias aisladas, por ejemplo,
15 células madre placentarias o células multipotentes placentarias, que son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-cadherina^{baja}, CD184/CXCR4⁻, β2-microglobulina^{baja}, MHC-I^{low}, MHC-II⁻, HLA-G^{baja}, y/o PDL1^{baja}. En una modalidad específica, las células placentarias aisladas son al menos CD29⁺ y
20 CD54⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas son al menos CD44⁺ y CD106⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas son al menos CD29⁺.

[00117] En otra modalidad, una población celular utilizada para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones
25 descritos en este documento comprende células placentarias aisladas, y al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95 %, 98% o 99% de las células en dicha población celular son células placentarias aisladas que son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-cadherin^{dim}, CD184/CXCR4⁻, β2-microglobulin^{dim}, HLA-I^{dim},
30 HLA-II⁻, HLA-G^{dim}, y/o PDL1^{dim}. En otra modalidad específica, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de células en dicha población celular son CD10⁺,

CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-cadherina^{dim}, CD184/CXCR4⁻, β 2-microglobulina^{dim}, MHC-I^{dim}, MHC-II⁻, HLA-G^{dim}, y PDL1^{dim}.

[00118] En otra modalidad, las células placentarias aisladas usadas para generar

5 las PDACs estimuladas descritas en este documento, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento son células placentarias aisladas que son una o más, o todas entre CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, y ABC-p⁺, donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de la placenta (también conocida como

10 proteína de resistencia a cáncer de mama) (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)), en donde dichas células placentarias aisladas se obtienen por perfusión de una placenta de mamífero, por ejemplo, humana, que se ha drenado de sangre de cordón umbilical y perfundido para eliminar sangre residual.

[00119] En otra modalidad específica de cualquiera de las características

15 anteriores, la expresión del marcador celular (por ejemplo, grupo de diferenciación o marcador inmunogénico) se determina por citometría de flujo; en otra modalidad específica, la expresión del marcador se determina por RT-PCR.

[00120] El perfil génico confirma que las células placentarias aisladas y las

poblaciones de células placentarias aisladas (por ejemplo, las células placentarias

20 aisladas y las poblaciones de células placentarias aisladas utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento) se distinguen de otras células, por ejemplo, células madre mesenquimales, por ejemplo, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. Las células placentarias aisladas descritas en este documento se pueden distinguir, por ejemplo, de células madre mesenquimales sobre

25 la base de la expresión de uno o más genes, cuya expresión es significativamente mayor en las células placentarias aisladas, o en ciertas células madre aisladas del cordón umbilical, en comparación con las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. En particular, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos de

30 tratamiento proporcionados en la presente, se pueden distinguir de las células madre mesenquimales sobre la base de la expresión de uno o más genes, cuya expresión es

significativamente más alta (es decir, al menos dos veces más alta) en las células placentarias aisladas que en un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, 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, IL1A, 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 cualquiera de los anteriores, cuando las células crecen en condiciones equivalentes. Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2007/0275362, cuya descripción se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. En ciertas modalidades específicas, dicha expresión de dicho uno o más genes se determina, por ejemplo, mediante RT-PCR o análisis de microarreglo, por ejemplo, usando un microarreglo U133-A (Affymetrix). En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas expresan dichos uno o más genes cuando se cultivan para una serie de duplicaciones de población, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 duplicaciones de población, en un medio que comprende DMEM-LG (por ejemplo, de Gibco); Suero de ternera fetal al 2% (por ejemplo, de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); Albúmina sérica bovina de ácido linoleico (LA-BSA); Dexametasona 10⁻⁹ M (por ejemplo, de Sigma); 2 - fosfato de ácido ascórbico 10⁻⁴ M (por ejemplo, de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (ej., de R & D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (por ejemplo, de R & D Systems). En otra modalidad específica, el gen específico a célula placentaria aislada o específico a célula aislada de cordón umbilical es CD200.

[00121] Secuencias específicas para estos genes se pueden encontrar en GenBank No. de Acceso NM_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), (NM_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM_001845 (COL4A1), NM_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758 (DMD), AF293359 (DSC3), NM_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM_018215 (FLJ10781),

AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (IL1A), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NM_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM_014476 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160 o BC065328 (SLC12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN), y BC005001 (ZC3H12A) como de Marzo de 2008.

[00122] En ciertas modalidades específicas, dichas células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento 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, IL1A, 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 detectablemente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, cuando las células crecen en condiciones equivalentes.

[00123] En modalidades específicas, las células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento expresan CD200 y ARTS1 (regulador de aminopeptidasa del factor de necrosis tumoral de tipo 1); ARTS-1 y LRAP (arginina aminopeptidasa derivada de leucocitos); IL6 (interleucina-6) y TGFB2 (factor de crecimiento transformante, beta2); IL6 y KRT18 (queratina 18); IER3 (respuesta temprana inmediata 3), MEST (homólogo de transcripción específico de mesodermo) y TGFB2; CD200 e IER3; CD200 e IL6; CD200 y KRT18; CD200 y LRAP; CD200 y MEST; CD200 y NFE2L3 (factor nuclear (derivado de eritroide 2) -tipo 3); o CD200 y TGFB2 a un nivel detectablemente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC) en las que dichas células madre mesenquimales derivadas de médula ósea han experimentado una serie de pasajes en cultivo equivalentes al número de pasajes al que dichas células placentarias aisladas han sido sometidas. En otras modalidades específicas, las

células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente expresan ARTS-1, CD200, IL6 y LRAP; ARTS-1, IL6, TGFB2, IER3, KRT18 y MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, y TGFB2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, y TGFB2; o IER3, MEST y TGFB2 a un nivel detectablemente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea BM-MS, en el que dichas células madre mesenquimales derivadas de médula ósea han experimentado una serie de pasos en cultivo equivalentes al número de pases al que dichas células placentarias aisladas han sido sometidas.

10 **[00124]** La expresión de los genes mencionados anteriormente puede evaluarse mediante técnicas estándar. Por ejemplo, las sondas basadas en la secuencia del gen (es) pueden seleccionarse individualmente y construirse mediante técnicas convencionales. La expresión de los genes puede evaluarse, por ejemplo, en una micromatriz que comprende sondas para uno o más de los genes, por ejemplo, una
15 matriz Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133A 2.0, o una matriz Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133 Plus 2.0 (Santa Clara, California)) La expresión de estos genes puede evaluarse incluso si la secuencia para un número de acceso de GenBank particular se modifica porque las sondas específicas para la secuencia modificada pueden generarse fácilmente usando técnicas estándar bien conocidas.

20 **[00125]** El nivel de expresión de estos genes puede usarse para confirmar la identidad de una población de células placentarias aisladas, para identificar una población de células que comprende al menos una pluralidad de células placentarias aisladas, o similares. Las poblaciones de células placentarias aisladas, cuya identidad se confirma, pueden ser clonales, por ejemplo, poblaciones de células placentarias
25 aisladas expandidas a partir de una única célula placentaria aislada, o una población mixta de células madre, por ejemplo, una población de células que comprende únicamente células placentarias aisladas que se expanden a partir de múltiples células placentarias aisladas, o una población de células que comprende células placentarias aisladas, como se describe en este documento, y al menos otro tipo de célula.

30 **[00126]** El nivel de expresión de estos genes se puede usar para seleccionar poblaciones de células placentarias aisladas. Por ejemplo, una población de células,

por ejemplo, células expandidas clonalmente, puede seleccionarse si la expresión de uno o más de los genes enumerados anteriormente es significativamente mayor en una muestra de la población de células que en una población equivalente de células madre mesenquimales. . Tal 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.

[00127] Las células placentarias aisladas utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento pueden seleccionarse en función del nivel de expresión de uno o más de tales genes en comparación con el nivel de expresión en dichos uno o más genes en, por ejemplo, un control de células madre mesenquimales, por ejemplo, el nivel de expresión en dichos uno o más genes en un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. En una modalidad, el nivel de expresión de dicho uno o más genes en una muestra que comprende un número equivalente de células madre mesenquimáticas se usa como control. En otra modalidad, el control, para células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente probadas 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.

[00128] En ciertas modalidades, las células placentarias (por ejemplo, PDACs) útiles en los métodos proporcionados en la presente, no expresan CD34, como se detecta por inmunolocalización, después de la exposición a 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En una modalidad específica, dichas células adherentes placentarias son adherentes al plástico de cultivo tisular. En otra modalidad específica, dicha población de células inducen a células endoteliales a formar brotes o estructuras similares a tubos cuando se cultivan en presencia de un factor angiogénico tal como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), por ejemplo, sobre un sustrato tal como MATRIGEL™.

[00129] En otro aspecto, las células placentarias usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, una población de células, por ejemplo, una población de PDACs, o una población de células en la que al menos aproximadamente

50%, 60%, 70%, 80%, 90 %, 95% o 98% de las células en dicha población aislada de células son PDACs, secretan uno o más, o todos entre VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, folistatina, G-CSF, EGF, ENA -78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR o galectina-1, por ejemplo, en un medio de cultivo en el que crecen la célula o células.

5 En otra modalidad, las células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento, expresan niveles aumentados de CD202b, IL-8 y/o VEGF en condiciones hipóxicas (por ejemplo, menos de aproximadamente O₂ al 5%) en comparación con las condiciones normóxicas (por ejemplo, aproximadamente 20% o aproximadamente O₂ al 21%).

10 **[00130]** En otra modalidad, cualquiera de las células placentarias o poblaciones de células que comprenden las células placentarias utilizadas para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente pueden provocar la formación de brotes o estructuras similares a tubos en una población de células endoteliales en contacto con dichas células adherentes derivadas de placenta . En una modalidad específica, las

15 células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, se cocultivan con células endoteliales humanas, que forman brotes o estructuras similares a tubos, o apoyan la formación de brotes de células endoteliales, por ejemplo, cuando se cultivan en el presencia de proteínas de matriz extracelular tales como colágeno tipo I y IV y/o factores angiogénicos tales como factor de

20 crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), por ejemplo, en o sobre un sustrato como colágeno placentario o MATRIGEL TM durante al menos 4 días. En otra modalidad, cualquiera de las poblaciones de células que comprenden células adherentes derivadas de placenta,

25 descritas en la presente, secretan factores angiogénicos tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), o Interleucina-8 (IL-8) y por lo tanto pueden inducir a las células endoteliales humanas a formar brotes o estructuras similares a tubos cuando se

30 cultivan en presencia de proteínas de matriz extracelular tales como colágeno tipo I y IV, por ejemplo, en o sobre un sustrato como colágeno placentario o MATRIGEL TM.

[00131] En otra modalidad, cualquiera de las poblaciones de células anteriores que comprenden células adherentes derivadas de placenta (PDAC) secretan factores angiogénicos. En modalidades específicas, la población de células secreta factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y/o interleucina-8 (IL-8) En otras modalidades específicas, la población de células que comprende las PDACs secreta uno o más factores angiogénicos y por lo tanto induce a las células endoteliales humanas a migrar en un ensayo de cicatrización de heridas in vitro. En otras modalidades específicas, la población de células que comprende células adherentes derivadas de placenta induce la maduración, diferenciación o proliferación de células endoteliales humanas, progenitores endoteliales, miocitos o mioblastos.

[00132] Las células placentarias aisladas descritas en este documento muestran las características anteriores (por ejemplo, combinaciones de marcadores de superficie celular y/o perfiles de expresión génica) en cultivo primario, o durante la proliferación en medio que comprende, por ejemplo, DMEM-LG (Gibco), suero de ternera fetal al 2% (FCS) (Hyclone Laboratories), 1x insulina-transferrina-selenio (ITS), 1x albúmina sérica bovina-ácido lenolénico 1x (LA-BSA), dexametasona 10^{-9} M (Sigma), 2- fosfato del ácido ascórbico 10^{-4} M(Sigma), factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml (R & D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (R & D Systems) y 100 U de penicilina/1000 U de estreptomicina.

[00133] En ciertas modalidades de cualquiera de las células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, las células son humanas. En ciertas modalidades de cualquiera de las células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, las características del marcador celular o las características de expresión del gen son marcadores humanos o genes humanos.

[00134] En otra modalidad específica de dichas células placentarias aisladas o poblaciones de células usadas para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente, 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 más, o se han proliferado 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, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 duplicaciones de población. En otra modalidad específica de dichas células placentarias aisladas o poblaciones de células usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, dichas células o población son aislados primarios. En otra modalidad específica de las células placentarias aisladas, o poblaciones de células que comprenden células placentarias aisladas, que se describen en la presente, dichas células placentarias aisladas son de origen fetal (es decir, tienen el genotipo fetal).

[00135] En ciertas modalidades, dichas células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, no se diferencian durante el cultivo en medio de crecimiento, es decir, el medio formulado para promover la proliferación, por ejemplo, durante la proliferación en medio de crecimiento. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas no requieren una capa de alimentación para proliferar. En otra modalidad 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 alimentación de células

[00136] En otra modalidad, las células usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente son células placentarias aisladas, en las que una pluralidad de dichas células placentarias aisladas son positivas para aldehído deshidrogenasa (ALDH), según se evalúa mediante ensayo de actividad de aldehído deshidrogenasa. Dichos ensayos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bostian y Betts, *Biochem. J.*, 173, 787, (1978)). En una modalidad específica, dicho ensayo ALDH usa ALDEFLUOR®(Aldagen, Inc., Ashland, Oregon) como un marcador de la actividad aldehído deshidrogenasa. En una modalidad específica, dicha pluralidad está entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 25% de las células en dicha población de células. En otra modalidad, se proporciona una población de células aisladas de cordón umbilical, por ejemplo, células de cordón umbilical aisladas multipotentes, en donde una pluralidad de dichas células de cordón umbilical aisladas son positivas para

aldehído deshidrogenasa, según se evalúa mediante un ensayo de actividad de aldehído deshidrogenasa que usa ALDEFLUOR® como un indicador de la actividad aldehído deshidrogenasa. En una modalidad específica, dicha pluralidad está entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 25% de las células en dicha población de células. En otra modalidad, dicha población de células placentarias aisladas o células de cordón umbilical aisladas muestra al menos tres veces o al menos cinco veces más actividad ALDH que una población de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea que tienen aproximadamente el mismo número de células y se cultivan en las mismas condiciones.

[00137] En ciertas modalidades de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células placentarias aisladas usadas para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente, las células 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% o 99% de las células placentarias en dicha población tiene un genotipo fetal. En ciertas otras modalidades de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden las células placentarias aisladas descritas en la presente, las poblaciones de células que comprenden dichas células 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% o 99% de las células en dicha población tienen un genotipo fetal.

[00138] En una modalidad específica de cualquiera de las células placentarias o poblaciones de células aisladas anteriormente utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, el cariotipo de las células, o al menos aproximadamente el 95% o aproximadamente el 99% de las células en dicha población, es normal. En otra modalidad específica de cualquiera de las células placentarias o poblaciones de células anteriores, las células, o células en la población de células, son de origen no materno.

[00139] Las células placentarias aisladas, o poblaciones de células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que llevan cualquiera de las combinaciones de marcadores anteriores, se pueden combinar

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

[00140] Las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la disrupción del tejido placentario, con o sin digestión enzimática (véase la Sección 5.3.3) o perfusión (ver Sección 5.3.4). Por ejemplo, pueden producirse poblaciones de células placentarias aisladas de acuerdo con un método que comprende perfundir una placenta de mamífero que se ha drenado de sangre de cordón y se ha perfundido para eliminar sangre residual; perfundir dicha placenta con una solución de perfusión; y recoger dicha solución de perfusión, en donde dicha solución 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 a partir de dicha población de células. En una modalidad específica, la solución de perfusión se pasa a través de la vena umbilical y las arterias umbilicales y se recoge después de que exuda desde la placenta. En otra modalidad específica, la solución 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.

[00141] En diversas modalidades, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, contenidas dentro de una población de células obtenidas por perfusión de placenta, son al menos 50%, 60%,

70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99.5% de dicha población de células placentarias. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas recogidas por perfusión comprenden células fetales y maternas. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas recogidas por perfusión son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% de células fetales.

[00142] En otra modalidad específica, se proporciona una composición que comprende una población de células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, recogidas por perfusión, donde dicha composición comprende al menos una porción de la solución de perfusión utilizada para recoger las células placentarias aisladas.

[00143] Las poblaciones aisladas de las células placentarias aisladas utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente pueden producirse digiriendo tejido placentario con una enzima disruptora de tejidos para obtener una población de células placentarias que comprende las células, y aislar, o aislar sustancialmente, una pluralidad de las células placentarias a partir de células placentarias del resto de dichas células placentarias. La totalidad o parte de la placenta se puede digerir para obtener las células placentarias aisladas descritas en este documento. En modalidades específicas, por ejemplo, dicho tejido placentario puede ser una placenta completa, una membrana amniótica, un corion, una combinación de amnios y corion, o una combinación de cualquiera de los anteriores. En otra modalidad específica, la enzima disruptora de tejido es tripsina o colagenasa. En diversas modalidades, las células placentarias aisladas, contenidas dentro de una población de células obtenidas de la digestión de una placenta, son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% de dicha población de células placentarias.

[00144] Las poblaciones aisladas de células placentarias descritas anteriormente, y las poblaciones de células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, generalmente pueden comprender aproximadamente, al menos, o no más de, 1×10^2 , 5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más de células placentarias aisladas. Las poblaciones de células placentarias

aisladas útiles en los métodos de tratamiento descritos en este documento comprenden al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de células placentarias aisladas viables, por ejemplo, tal como se determina mediante, por ejemplo, exclusión con azul tripán.

5 **5.2.3 Crecimiento en Cultivo**

- [00145]** El crecimiento de las células placentarias aisladas descritas en la presente en la Sección 5.2, por ejemplo, células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, como para cualquier célula de mamífero, depende en parte del medio particular seleccionado para el crecimiento. En
- 10 condiciones óptimas, las células placentarias aisladas suelen duplicarse en aproximadamente 1 día. Durante el cultivo, las células placentarias aisladas descritas en este documento se adhieren a un sustrato en cultivo, ej., la superficie de un recipiente de cultivo tisular (por ejemplo, plástico de plato de cultivo tisular, plástico revestido con fibronectina, y similares) y forman una monocapa.
- 15 **[00146]** Las poblaciones de células placentarias que comprenden las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, cuando se cultivan en condiciones apropiadas, pueden formar cuerpos de tipo embrioide, es decir, grupos tridimensionales de células que crecen encima de la capa de células adherentes. Las células dentro de los cuerpos de tipo embrioide
- 20 pueden expresar marcadores asociados con células madre muy tempranas, por ejemplo, OCT-4, Nanog, SSEA3 y SSEA4. Las células dentro de los cuerpos tipo embrioide típicamente no son adherentes al sustrato de cultivo, como lo son las células placentarias aisladas descritas en la presente, pero tienden a permanecer unidas a las células adherentes durante el cultivo. Las células del cuerpo de tipo embrioide
- 25 dependen de la viabilidad de las células placentarias aisladas adherentes, ya que los cuerpos de tipo embrioide no se forman en ausencia de las células placentarias aisladas adherentes. Las células placentarias aisladas adherentes facilitan así el crecimiento de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprenden las células placentarias aisladas adherentes. Sin
- 30 pretender imponer ninguna teoría, se cree que las células de los cuerpos tipo embrioide

crecen en las células placentarias aisladas adherentes, del mismo modo que las células madre embrionarias crecen en una capa de alimentación de células.

5.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS PLACENTARIAS AISLADAS

5.3.1 Composición de la Recolección de Células Madre

- 5 **[00147]** También se proporcionan en la presente métodos para recoger y aislar células placentarias, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2 anterior, por ejemplo, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento. Generalmente, tales células se obtienen de una placenta de mamífero usando una solución fisiológicamente
- 10 aceptable, por ejemplo, una composición de colección de células. Una composición de colección de células de ejemplo se describe en detalle en la Publicación de Solicitud de Patente EE.UU. relacionada No. 2007/0190042, titulada "Medio Mejorado para Recolección de Células Madre Placentarias y Órganos Conservantes", cuya descripción se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.
- 15 **[00148]** La composición de colección de células puede comprender cualquier solución fisiológicamente aceptable adecuada para la recogida y/o cultivo de células, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en la presente, por ejemplo, una solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, solución de Krebs, solución de Krebs modificada, solución de Eagle, 0.9% NaCl. etc.), un medio de cultivo
- 20 (por ejemplo, DMEM, H.DMEM, etc.) y similares.
- [00149]** La composición de colección de células puede comprender uno o más componentes que tienden a preservar las células placentarias aisladas, es decir, evitar la muerte de las células placentarias aisladas, o retrasar la muerte de las células placentarias aisladas, reducir el número de células placentarias aisladas que mueren
- 25 en una población de células, o similares, desde el momento de la recolección hasta el momento del cultivo. Dichos componentes pueden ser, por ejemplo, un inhibidor de apoptosis (por ejemplo, un inhibidor de caspasa o un inhibidor de JNK); un vasodilatador (por ejemplo, sulfato de magnesio, un fármaco antihipertensivo, péptido natriurético auricular (ANP), adrenocorticotropina, hormona liberadora de corticotropina,
- 30 nitroprusiato de sodio, hidralazina, adenosina trifosfato, adenosina, indometacina o

sulfato de magnesio, un inhibidor de la 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.).

- 5 **[00150]** La composición de colección de células puede comprender una o más enzimas de degradación de tejidos, por ejemplo, una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una RNasa o una DNasa o similares. Dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, colagenasas (por ejemplo, colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, 10 LIBERASA, hialuronidasa y similares.

- [00151]** La composición de colección de células puede comprender una cantidad bactericida o bacteriostáticamente efectiva de un antibiótico. En ciertas modalidades no limitantes, el antibiótico es un macrólido (por ejemplo, tobramicina), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, 15 cefixima o cefadroxilo), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (por ejemplo, penicilina V) o una quinolona (ej., ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En una modalidad particular, el antibiótico es activo contra bacterias Gram (+) y/o Gram (-), por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y similares. En una modalidad, el antibiótico es gentamicina, 20 por ejemplo, entre 0.005% y 0.01% aproximadamente (p/v) en medio de cultivo.

- [00152]** La composición de colección de células también puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (20 mM a 100 mM aproximadamente); iones de magnesio (1 mM a 50 mM aproximadamente); una macromolécula de peso molecular 25 mayor que 20,000 daltons, en una modalidad, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad endotelial y la viabilidad celular (por ejemplo, un coloide sintético o de origen natural, un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente entre 25 g/l y 100 g/l aproximadamente, o entre 40 g/l y 60 g/l) aproximadamente; un antioxidante (por ejemplo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, 30 vitamina C o vitamina E presentes entre 25 μ M y 100 μ M); un agente reductor (por ejemplo, N-acetilcisteína presente entre 0.1 mM y 5 mM aproximadamente); un agente

que previene la entrada de calcio en las células (por ejemplo, verapamil presente entre 2 μ M y 25 μ M aproximadamente); nitroglicerina (por ejemplo, entre 0.05 g/l y 0.2 g/l aproximadamente); un anticoagulante, en una modalidad, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de sangre residual (por ejemplo, 5 heparina o hirudina presente a una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (por ejemplo, amilorida, etilisopropil amilorida, hexametilen amilorida, dimetil amilorida o isobutil amilorida presente entre 1.0 μ M y 5 μ M aproximadamente).

5.3.2 Recolección y Manejo de Placenta

- 10 **[00153]** En general, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento. En una modalidad 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, la historia médica continúa después del parto. Tal historia médica se
- 15 puede usar para coordinar el uso posterior de la placenta o las células placentarias aisladas cosechadas de allí. Por ejemplo, se pueden usar células placentarias humanas aisladas, a la luz de los antecedentes médicos, para medicamentos personalizados para el bebé asociado con la placenta, o para padres, hermanos u otros parientes del bebé.
- 20 **[00154]** Antes de la recuperación de las células placentarias aisladas, la sangre del cordón umbilical y la sangre de la placenta se eliminan preferiblemente. En ciertas modalidades, después del parto, se recupera la sangre del cordón umbilical en la placenta. La placenta puede someterse a un proceso de recuperación de sangre de cordón convencional. Típicamente, se usa una aguja o cánula, con la ayuda de la
- 25 gravedad, para desangrar la placenta (véase, por ejemplo, Anderson, patente EE.UU. No. 5.372.581, Hessel, Patente 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 de la placenta. Tal recuperación de sangre de cordón se puede realizar comercialmente, por ejemplo,
- 30 LifeBank USA, Cedar Knolls, N.J. Preferiblemente, la placenta se drena por gravedad

sin manipulación adicional para minimizar la alteración del tejido durante la recuperación de la sangre del cordón umbilical.

[00155] Típicamente, una placenta se transporta desde la sala de parto a otra ubicación, por ejemplo, un laboratorio, para la recuperación de sangre del cordón

5 umbilical y la recolección de células madre mediante, por ejemplo, perfusión o disociación tisular. La placenta se transporta preferentemente 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 fijado, en una bolsa de plástico estéril con cierre hermético, que luego se coloca en un
10 contenedor aislado. En otra modalidad, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre de cordón sustancialmente como se describe en la patente de los Estados Unidos pendiente número 7.147.626, cuya divulgación se incorpora en la presente como referencia. Preferiblemente, la placenta se entrega al laboratorio de cuatro a veinticuatro horas después del parto. En ciertas modalidades, el cordón umbilical
15 proximal se fija con pinza, preferiblemente dentro de 4-5 cm (centímetro) de la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de la sangre del cordón umbilical. En otras modalidades, el cordón umbilical proximal se pinza después de la recuperación de la sangre del cordón umbilical, pero antes del procesamiento adicional de la placenta.

20 **[00156]** La placenta, antes de la recolección de células, se puede almacenar en condiciones estériles y a temperatura ambiente o a una temperatura entre 5 °C y 25 °C. La placenta puede almacenarse durante un período de cuatro a veinticuatro horas, hasta cuarenta y ocho horas o más de cuarenta y ocho horas, antes de perfundir la placenta para eliminar cualquier residuo de sangre del cordón umbilical. En una
25 modalidad, la placenta se cosecha de entre aproximadamente cero horas y aproximadamente dos horas después de la expulsión. La placenta se almacena preferiblemente en una solución anticoagulante a una temperatura entre 5 °C y 25 °C. Las soluciones anticoagulantes adecuadas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar una solución de heparina o warfarina sódica. En una
30 modalidad preferida, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (por ejemplo, 1% p/p en solución 1: 1000). La placenta exsanguinada se almacena

preferiblemente durante no más de 36 horas antes de la recolección de las células placentarias.

[00157] La placenta de mamífero o una parte de la misma, una vez recogida y preparada generalmente como se describió anteriormente, puede tratarse de cualquier manera conocida en la técnica, por ejemplo, puede perfundirse o romperse, por ejemplo, digerirse con una o más enzimas que interrumpen el tejido para obtener células placentarias aisladas.

5.3.3 Interrupción Física y Digestión Enzimática del Tejido Placentario

[00158] En una modalidad, las células madre se obtienen de una placenta de mamífero mediante la interrupción física de parte de todo el órgano. Por ejemplo, la placenta, o una porción de la misma, puede estar, por ejemplo, aplastada, cizallada, picada, troceada, macerada o similar. Luego el tejido puede cultivarse para obtener una población de células placentarias aisladas. Típicamente, el tejido placentario se rompe usando, por ejemplo, medio de cultivo, una solución salina o una composición de colección de células madre (véase la Sección 5.5.1 y más adelante).

[00159] La placenta se puede diseccionar en componentes antes de la disrupción física y/o la digestión enzimática y la recuperación de células madre. Las células placentarias aisladas se pueden obtener a partir de la totalidad o una parte de la membrana amniótica, el corion, el cordón umbilical, los cotiledones placentarios o cualquier combinación de los mismos, incluso de una placenta completa.

Preferiblemente, las células placentarias aisladas se obtienen a partir de tejido placentario que comprende amnios y corion. Típicamente, las células placentarias aisladas se pueden obtener mediante la ruptura de un pequeño bloque de tejido placentario, por ejemplo, un bloque de tejido placentario que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 milímetros cúbicos aproximadamente de volumen. Se puede usar cualquier método de disrupción física, siempre que el método de alteración deje una pluralidad, más preferiblemente una mayoría, y más preferiblemente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicho órgano viable, tal como se determina mediante, por ejemplo, exclusión con azul tripán.

[00160] Las células placentarias adherentes aisladas generalmente se pueden recoger de una placenta, o parte de la misma, en cualquier momento dentro de aproximadamente los primeros tres días después de la expulsión, pero preferiblemente entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 18 horas después de la expulsión.

5 **[00161]** En una modalidad específica, el tejido alterado se cultiva en un medio de cultivo tisular adecuado para la proliferación de células placentarias aisladas (véase, por ejemplo, la Sección 5.6, a continuación, que describe el cultivo de células placentarias, por ejemplo, PDACs).

[00162] En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas se recogen
10 mediante la disrupción física del tejido placentario, en donde la disrupción física incluye la digestión enzimática, que se puede lograr mediante el uso de una o más enzimas que digieren los tejidos. La placenta, o una porción de la misma, también puede romperse físicamente y digerirse con una o más enzimas, y el material resultante puede sumergirse o mezclarse en una composición de colección de células.

15 **[00163]** Una composición de colección de células preferida comprende una o más enzima (s) que alteran el tejido. Las enzimas que se pueden usar para romper el tejido placentario incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina, collagenasa, dispasa o elastasa. Las serina proteasas pueden ser inhibidas por la alfa 2 microglobulina en el suero y, por lo tanto, el medio utilizado
20 para la digestión suele estar libre de suero. EDTA y DNasa se usan comúnmente en los procedimientos de digestión enzimática para aumentar la eficacia de la recuperación celular. El digestato se diluye preferiblemente para evitar atrapar las células dentro de la digestión viscosa.

[00164] Se puede usar cualquier combinación de enzimas de digestión tisular.
25 Las concentraciones típicas para la digestión que usan tripsina incluyen, de 0,1% a 2% de tripsina, ej., 0.25% de tripsina aproximadamente. Las proteasas se pueden usar en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o se pueden usar secuencialmente para liberar células placentarias, por ejemplo, células madre placentarias y células multipotentes placentarias. Por ejemplo, en una
30 modalidad, una placenta, o parte de la misma, se digiere primero con una cantidad apropiada de collagenasa I entre 1 y 2 mg/ml aproximadamente durante, por ejemplo, 30

minutos, seguido de digestión con tripsina, a una concentración de 0.25% aproximadamente, por ejemplo, 10 minutos, a 37°C. Las serina proteasas se usan preferiblemente consecutivamente después del uso de otras enzimas.

[00165] En otra modalidad, el tejido puede romperse adicionalmente mediante la adición de un quelante, por ejemplo, etilenglicol bis (2-aminoetiléter) -N, N, N'N'-ácido tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la composición de colección de células madre que comprende las células madre, o a una solución en la que el tejido se rompe y/o se digiere antes del aislamiento de las células madre con la composición de colección de células madre.

[00166] Después de la digestión, el digestato se lava, por ejemplo, tres veces con medio de cultivo, y las células lavadas se siembran en matraces de cultivo. Las células se aíslan después por adherencia diferencial y se caracterizan por, por ejemplo, viabilidad, marcadores de superficie celular, diferenciación y similares.

[00167] Se apreciará que cuando una placenta completa, o una porción de placenta que comprende células tanto fetales como maternas (por ejemplo, donde la porción de la placenta comprende el corion o cotiledones), las células placentarias aisladas pueden comprender una mezcla de células placentarias derivadas de fuentes fetales y maternas. Cuando una porción de la placenta que no comprende, o comprende un número insignificante de células maternas (por ejemplo, amnios), las células placentarias aisladas a partir de la misma comprenderán casi exclusivamente células placentarias fetales (es decir, células placentarias que tienen el genotipo del feto) .

[00168] Las células placentarias, por ejemplo, las células placentarias descritas en la Sección 5.2.2 anterior, pueden aislarse a partir del tejido placentario interrumpido mediante tripsinización diferencial (consulte la Sección 5.3.5, a continuación) seguido de cultivo en uno o más contenedores de cultivo nuevos en medio de proliferación fresco, opcionalmente seguido de una segunda etapa de tripsinización diferencial.

5.3.4 Perfusión Placentaria

[00169] Las células placentarias, por ejemplo, las células placentarias descritas en la Sección 5.2.2 anterior, por ejemplo, las células placentarias usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente también pueden obtenerse por

perfusión de la placenta de mamífero. Los métodos para perfundir placenta de mamífero para obtener células placentarias se describen, por ejemplo, en Hariri, Patentes de Estados Unidos No. 7.045.148 y 7.255.729, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2007/0275362 y 2007/0190042, las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

[00170] Las células placentarias se pueden recoger por perfusión, por ejemplo, a través de la vasculatura placentaria, usando, por ejemplo, una composición de colección de células como una solución de perfusión. En una modalidad, una placenta de mamífero se perfunde mediante el paso de una solución de perfusión a través de una o ambas arterias umbilicales y de la vena umbilical. El flujo de la solución de perfusión a través de la placenta se puede lograr usando, por ejemplo, flujo de gravedad en la placenta. Preferiblemente, la solución de perfusión se fuerza a través de la placenta usando una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica. La vena umbilical puede estar, por ejemplo, canulada con una cánula, por ejemplo, una cánula TEFLON® o de plástico, que está conectada a un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión.

[00171] 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 a través de la vasculatura placentaria y el tejido circundante. La placenta también se puede perfundir mediante el paso de un fluido de perfusión en la vena umbilical y la recolección desde las arterias umbilicales, o el paso de un fluido de perfusión en las arterias umbilicales y la recolección desde la vena umbilical.

[00172] En una modalidad, por ejemplo, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente, por ejemplo, a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un depósito de la solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa a la vena umbilical y la arteria. La solución 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 adjuntó al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también se puede introducir a través de la abertura del cordón umbilical y dejar fluir o filtrar por las aberturas en la pared de la placenta que se interconecta con la pared
5 uterina materna. Las células placentarias que se recolectan mediante este método, que se pueden denominar método "pan", son típicamente una mezcla de células fetales y maternas.

[00173] En otra modalidad, la solución 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
10 y se recoge de las venas umbilicales. Las células placentarias recolectadas mediante este método, que se puede denominar método de "circuito cerrado", son típicamente casi exclusivamente fetales.

[00174] Se apreciará que la perfusión usando el método de la bandeja, es decir, mediante la cual se recoge el perfundido después de que ha exudado del lado materno
15 de la placenta, da como resultado una mezcla de células fetales y maternas. Como resultado, las células recogidas mediante este método pueden comprender una población mixta de células placentarias, por ejemplo, células madre placentarias o células multipotentes placentarias, tanto de origen fetal como materno. En contraste, la perfusión únicamente a través de la vasculatura placentaria en el método de circuito
20 cerrado, mediante el cual el fluido de perfusión pasa a través de uno o dos vasos placentarios y se recolecta únicamente a través de los vasos restantes, resulta en la recolección de una población de células placentarias casi exclusivamente de origen fetal

[00175] El método de perfusión de circuito cerrado puede, en una modalidad,
25 realizarse de la siguiente manera. Se obtiene una placenta posparto dentro de las 48 horas posteriores al nacimiento. El cordón umbilical se sujeta y corta por encima de la abrazadera. El cordón umbilical se puede descartar, o se puede procesar para recuperar, por ejemplo, células madre del cordón umbilical y/o procesar la membrana del cordón umbilical para la producción de un biomaterial. La membrana amniótica
30 puede retenerse durante la perfusión, o puede separarse del corion, por ejemplo, usando una disección roma con los dedos. Si la membrana amniótica se separa del

corion antes de la perfusión, puede ser, por ejemplo, descartada o procesada, por ejemplo, para obtener células madre mediante digestión enzimática, o para producir, por ejemplo, un biomaterial de membrana amniótica, por ejemplo, el biomaterial descrito en la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos No. 2004/0048796, cuya descripción se incorpora como referencia en este documento en su totalidad. Después de limpiar la placenta de todos los coágulos sanguíneos visibles y la sangre residual, por ejemplo, usando una gasa estéril, los vasos del cordón umbilical se exponen, por ejemplo, cortando parcialmente la membrana del cordón umbilical para exponer una sección transversal del cordón. Los recipientes se identifican y se abren, por ejemplo, haciendo avanzar una abrazadera de cocodrilo cerrada a través del extremo cortado de cada recipiente. El aparato, por ejemplo, un tubo de plástico conectado a un dispositivo de perfusión o bomba peristáltica, se inserta luego en cada una de las arterias placentarias. La bomba puede ser cualquier bomba adecuada para el propósito, por ejemplo, una bomba peristáltica. A continuación, se inserta un tubo de plástico, conectado a un depósito de recogida estéril, por ejemplo, una bolsa de sangre tal como una bolsa de recogida de 250 ml, en la vena placentaria. Alternativamente, el tubo conectado a la bomba se inserta en la vena placentaria, y los tubos a un depósito (s) de recolección se insertan en una o ambas arterias placentarias. La placenta se perfunde luego con un volumen de solución de perfusión, por ejemplo, aproximadamente 750 ml de solución de perfusión. Las células en el perfundido se recogen luego, por ejemplo, mediante centrifugación. En ciertas modalidades, la placenta se perfunde con solución de perfusión, por ejemplo, 100-300 ml de solución de perfusión, para eliminar la sangre residual antes de la perfusión para recoger células placentarias, por ejemplo, células madre placentarias y/o células multipotentes placentarias. En otra modalidad, la placenta no se perfunde con solución de perfusión para eliminar la sangre residual antes de la perfusión para recoger las células placentarias.

[00176] En una modalidad, el cordón umbilical proximal se sujeta con pinza durante la perfusión, y más preferiblemente, se sujeta dentro de 4-5 cm (centímetro) de la inserción del cordón en el disco placentario.

[00177] La primera colección de líquido de perfusión de una placenta de mamífero durante el proceso de exanguinación generalmente se colorea con glóbulos rojos

residuales de la sangre del cordón y/o sangre de la placenta. El fluido de perfusión se vuelve más incoloro a medida que avanza la perfusión y las células sanguíneas residuales del cordón se eliminan por lavado de la placenta. Generalmente, de 30 a 100 ml (ml) de líquido de perfusión es adecuado para inicialmente desangrar la placenta, pero se puede usar más o menos fluido de perfusión dependiendo de los resultados observados.

[00178] El volumen de líquido de perfusión utilizado para aislar las células placentarias puede variar dependiendo del número de células que se van a recolectar, el tamaño de la placenta, el número de colecciones que se realizarán a partir de una única placenta, etc. En diversas modalidades, el volumen de líquido de perfusión puede ser de 50 ml a 5000 ml, de 50 ml a 4000 ml, de 50 ml a 3000 ml, de 100 ml a 2000 ml, de 250 ml a 2000 ml, de 500 ml a 2000 ml o de 750 ml a 2000 ml. Normalmente, la placenta se perfunde con 700-800 ml de líquido de perfusión después de la exsanguinación.

[00179] La placenta se puede perfundir una pluralidad de veces en el transcurso de varias horas o varios días. Cuando la perfusión de placenta se realiza una pluralidad de veces, puede mantenerse o cultivarse en condiciones asépticas en un recipiente u otro recipiente adecuado, y perfundirse con la composición de colección de células, o una solución de perfusión estándar (por ejemplo, una solución salina normal tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (por ejemplo, heparina, warfarina sódica, cumarina, bishidroxycumarina) 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 40U/ml), anfotericina B (por ejemplo, a 0.5 μ g/ml). En una modalidad, una placenta aislada se mantiene o se cultiva durante un período de tiempo sin recoger el perfundido, de manera que la placenta se mantiene o se cultiva durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 horas, o 2 o 3 o más días antes de la perfusión y recolección del perfundido. La placenta perfundida se puede mantener durante uno o más periodos de tiempo adicionales, 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 o más horas, y puede ser perfundida una segunda vez con, por ejemplo, 700-800 ml de fluido de perfusión. La

placenta se puede perfundir 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En una modalidad preferida, la perfusión de la placenta y la recogida de la solución de perfusión, por ejemplo, la composición de colección de células, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos en diferentes momentos pueden procesarse adicionalmente individualmente para recuperar poblaciones de células dependientes del tiempo, por ejemplo, células madre. Los perfundidos de diferentes puntos de tiempo también se pueden agrupar. En una modalidad preferida, las células placentarias se recogen en un periodo o periodos de tiempo entre 8 horas y 18 horas aproximadamente después de la expulsión.

[00180] La perfusión preferiblemente da como resultado la recogida de significativamente más células placentarias que el número obtenible a partir de una placenta de mamífero no perfundida con dicha solución, y no tratada para obtener células placentarias (por ejemplo, mediante disrupción tisular, por ejemplo, digestión enzimática). En este contexto, "significativamente más" significa al menos un 10% más. La perfusión produce significativamente más células placentarias que, por ejemplo, el número de células placentarias que se pueden aislar del medio de cultivo en el que se ha cultivado una placenta, o una porción de la misma.

[00181] Las células placentarias se pueden aislar de la placenta mediante perfusión con una solución que comprende una o más proteasas u otras enzimas que alteran el tejido. En una modalidad específica, una placenta o parte de la misma (por ejemplo, membrana amniótica, amnios y corion, lóbulo o cotiledón placentario, cordón umbilical o combinación de cualquiera de los anteriores) se lleva a 25-37°C, y se incuba con una o más enzimas que alteran los tejidos en 200 ml de un medio de cultivo durante 30 minutos. Las células del perfundido se recogen, se llevan a 4 °C y se lavan con una mezcla de inhibidor frío que comprende EDTA 5 mM, ditioneitol 2 mM y beta-mercaptoetanol 2 mM. Las células placentarias se lavan después de varios minutos con una composición de colección de células madre fría (por ejemplo, 4°C).

5.3.5 Aislamiento, Clasificación y Caracterización de las Células Placentarias

[00182] Las células placentarias aisladas, por ejemplo, las células descritas en la Sección 5.2.2 anterior, por ejemplo, las células placentarias aisladas usadas para
5 generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, ya sea obtenidas por perfusión o por disrupción física, por ejemplo, mediante digestión enzimática, pueden purificarse inicialmente a partir de (es decir, aislarse) otras células mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Dicha centrifugación puede seguir cualquier protocolo estándar para velocidad de centrifugación, etc. En una modalidad, por
10 ejemplo, las células recogidas de la placenta se recuperan del perfundido mediante centrifugación a 5000xg durante 15 minutos a temperatura ambiente, lo cual separa las células de, por ejemplo, desechos y plaquetas contaminantes. En otra modalidad, el perfundido placentario se concentra a aproximadamente 200 ml, se deposita suavemente en capas sobre Ficoll, y se centrifuga a aproximadamente 1100xg durante
15 20 minutos a 22°C, y la capa de células de interfaz de baja densidad se recoge para su posterior procesamiento.

[00183] Los sedimentos celulares pueden resuspenderse en una composición de colección de células madre frescas, o un medio adecuado para el mantenimiento celular, por ejemplo, mantenimiento de células madre, por ejemplo, medio libre de
20 suero IMDM que contiene 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY). La fracción de células mononucleares total puede aislarse, por ejemplo, usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.

[00184] Las células placentarias obtenidas por perfusión o digestión pueden, por
25 ejemplo, aislarse adicionalmente, o inicialmente, por tripsinización diferencial usando, por ejemplo, una solución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma, St. Louis, MO). La tripsinización diferencial es posible porque las células placentarias aisladas, que son adherentes al plástico de cultivo tisular, típicamente se desprenden de las superficies plásticas en aproximadamente cinco minutos, mientras que otras
30 poblaciones adherentes típicamente requieren más de 20-30 minutos de incubación. Las células placentarias desprendidas se pueden recoger después de la tripsinización y

la neutralización con tripsina, usando, por ejemplo, Solución Neutralizante de Tripsina (TNS, Cambrex). En una modalidad del aislamiento de células adherentes, se colocan alícuotas de, por ejemplo, aproximadamente $5-10 \times 10^6$ células en cada uno de varios matraces T-75, preferiblemente matraces T75 revestidos con fibronectina. En tal

5 modalidad, las células se pueden cultivar con medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas comercialmente disponible (MSCGM) (Cambrex), y se pueden colocar en un incubador de cultivo tisular (37°C , 5% de CO_2). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiran de los matraces mediante lavado con PBS. El PBS luego es reemplazado por MSCGM. Los matraces se examinan

10 preferiblemente diariamente para determinar la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y expansión de grupos de células fibroblastoides.

[00185] El número y tipo de células recogidas de una placenta de mamífero se puede controlar, por ejemplo, midiendo cambios en la morfología y marcadores de

15 superficie celular usando técnicas de detección celular estándar tales como citometría de flujo, clasificación de células, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de inmunocitoquímica (por ejemplo, tinción con anticuerpos específicos a tejidos o específicos a marcadores celulares), clasificación celular activada magnéticamente (MACS), mediante el examen de la morfología de las células usando microscopía

20 óptica o confocal, y/o midiendo cambios en la expresión génica usando técnicas bien conocidas en la técnica, como PCR y perfiles de expresión génica. Estas técnicas también se pueden usar para identificar células que son positivas para uno o más marcadores particulares. Por ejemplo, usando anticuerpos para CD34, se puede determinar, usando las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad

25 detectable de CD34; si es así, la célula es CD34+. Del mismo modo, si una célula produce suficiente ARN OCT-4 para ser detectable por RT-PCR, o significativamente más ARN OCT-4 que una célula adulta, la célula es OCT-4⁺. Los anticuerpos para marcadores de superficie celular (por ejemplo, marcadores de CD tales como CD34) y la secuencia de genes específicos de células madre, tales como OCT-4, son bien

30 conocidos en la técnica.

[00186] Las células placentarias, particularmente las células que se han aislado por separación de Ficoll, adherencia diferencial o una combinación de ambas, se pueden clasificar utilizando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). La clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, que incluyen células, basándose en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151: 150 - 165). La excitación por láser de las fracciones fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En una modalidad, los anticuerpos o ligandos específicos a marcador de superficie celular se marcan con marcadores fluorescentes distintos. Las células se procesan a través del clasificador celular, lo que permite la separación de las células en función de su capacidad para unirse a los anticuerpos utilizados. Las partículas clasificadas FACS pueden depositarse directamente en pozos individuales de placas de 96 pozos o de 384 pozos para facilitar la separación y la clonación.

[00187] En un esquema de clasificación, las células de placenta, por ejemplo, las PDACs se clasifican sobre la base de la expresión de uno o más de los marcadores CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 y/o HLA-G. Esto se puede lograr en relación con los procedimientos para seleccionar tales células en función de sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, la selección de la adherencia al plástico del cultivo tisular puede realizarse antes o después de la clasificación sobre la base de la expresión del marcador. En una modalidad, por ejemplo, las células se clasifican primero sobre la base de su expresión de CD34; las células CD34⁺ se retienen, y las células CD34⁻ que son adicionalmente CD200⁺ y HLA-G⁻ se separan de las demás células CD34⁻. En otra modalidad, las células de placenta se clasifican en función de su expresión de los marcadores CD200 y/o HLA-G; por ejemplo, las células que muestran CD200 y que carecen de HLA-G se aíslan para su uso posterior. Las células que expresan, por ejemplo, CD200 y/o carecen, por ejemplo, de HLA-G pueden, en una modalidad específica, clasificadas adicionalmente basándose en su expresión de CD73 y/o CD105, o epítomos reconocidos por anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o falta de expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, en otra modalidad, las

células placentarias se clasifican por expresión, o falta de ellas, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y células placentarias que son CD200⁺, HLA-G⁻, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻ son aisladas de otras células placentarias para su uso posterior.

- 5 **[00188]** En modalidades específicas de cualquiera de las modalidades anteriores de células placentarias clasificadas, al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células en una población celular restante después de la clasificación son dichas células placentarias aisladas. Las células placentarias se pueden clasificar por uno o más de cualquiera de los marcadores descritos en la Sección 5.2.2 anterior.
- 10 **[00189]** En una modalidad específica, por ejemplo, las células placentarias que son (1) adherentes al plástico de cultivo tisular, y (2) CD10⁺, CD34⁻ y CD105⁺ se clasifican a partir de (es decir, se aíslan de) otras células placentarias. En otra modalidad específica, las células placentarias que son (1) adherentes al plástico de cultivo tisular, y (2) CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ y CD200⁺ se clasifican a partir de (es decir, se aíslan de) otras células placentarias. En otra modalidad específica, las células placentarias que son (1) adherentes al plástico de cultivo tisular y (2) CD10⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺ se clasifican a partir de (es decir, se aíslan de) otras células placentarias.
- 15 **[00190]** Con respecto a la detección de células placentarias basada en la secuencia de nucleótidos, las secuencias para los marcadores enumeradas en la presente están fácilmente disponibles en bases de datos disponibles públicamente tales como GenBank o EMBL.
- 20 **[00191]** Con respecto a la detección y clasificación mediada por anticuerpos de células placentarias, por ejemplo, células madre placentarias o células multipotentes placentarias, se puede usar cualquier anticuerpo específico para un marcador particular, en combinación con cualquier fluoróforo u otra etiqueta adecuada para la detección y clasificación de células (ej., clasificación celular activada por fluorescencia). Las combinaciones de anticuerpo/fluoróforo para marcadores específicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de
- 25 fluoresceína (FITC) contra HLA-G (disponible en Serotec, Raleigh, NC), CD10 (disponible en BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA), CD44 (disponible de BD
- 30

Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), y CD105 (disponible de R & D Systems Inc., Minneapolis, MN); anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (PE) contra CD44, CD200, CD117 y CD13 (BD Biosciences Pharmingen); ficoeritrina-Cy7 (PE Cy7) anticuerpos monoclonales conjugados contra CD33 y CD10 (BD Biosciences

5 Pharmingen); estreptavidina conjugada con aloficocianina (APC) y anticuerpos monoclonales contra CD38 (BD Biosciences Pharmingen); y CD90 biotinilado (BD Biosciences Pharmingen). Otros anticuerpos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, CD133-APC (Miltenyi), KDR-Biotina (CD309, Abcam), CytokeratinK-Fitc (Sigma o Dako), HLA ABC-Fitc (BD), HLA DR, DQ, DP-PE (BD), β -2-microglobulina-PE
10 (BD), CD80-PE (BD) y CD86-APC (BD). Otras combinaciones de anticuerpo/etiqueta que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, CD45-PerCP (proteína de clorofila peridin); CD44-PE; CD19-PE; CD10-F (fluoresceína); HLA-G-F y 7-amino-actinomicina-D (7-AAD); HLA-ABC-F; y similares. Esta lista no es exhaustiva, y otros anticuerpos de otros proveedores también están disponibles comercialmente.

15 **[00192]** Las células placentarias aisladas proporcionadas en la presente pueden ensayarse para CD117 o CD133 usando, por ejemplo, estreptavidina conjugada con ficoeritrina-Cy5 (PE Cy5) y anticuerpos monoclonales conjugados con biotina contra CD117 o CD133; sin embargo, al usar este sistema, las células pueden parecer
positivas para CD117 o CD133, respectivamente, debido a un fondo relativamente alto.

20 **[00193]** Las células placentarias aisladas pueden marcarse con un anticuerpo frente a un solo marcador y detectarse y/clasificarse. Las células placentarias también se pueden marcar simultáneamente con múltiples anticuerpos contra diferentes marcadores.

[00194] En otra modalidad, se pueden usar perlas magnéticas para separar las
25 células. Las células se pueden clasificar utilizando una técnica de clasificación celular activada magnética (MACS), un método para separar partículas en función de su capacidad para unir perlas magnéticas (0,5-100 μ m de diámetro). Se puede realizar una variedad de modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, que incluyen la adición covalente de anticuerpo que reconoce específicamente una molécula o hapteno
30 de la superficie celular particular. Luego las perlas se mezclan con las células para permitir la unión. Las células se pasan luego a través de un campo magnético para

separar las células que tienen el marcador de superficie celular específico. En una modalidad, estas células se pueden aislar y volver a mezclar con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de superficie celular adicionales. Las células se pasan de nuevo a través de un campo magnético, aislando las células que unen ambos anticuerpos. Dichas células pueden diluirse luego en platos separados, tales como platos de microtitulación para aislamiento clonal.

[00195] Las células placentarias aisladas también se pueden caracterizar y/o clasificar según la morfología celular y las características de crecimiento. Por ejemplo, las células placentarias aisladas se pueden caracterizar por tener y/o seleccionarse sobre la base de, por ejemplo, un aspecto fibroblastoideo en cultivo. Las células placentarias aisladas también se pueden caracterizar por tener, y/o seleccionarse, sobre la base de su capacidad para formar cuerpos de tipo embrioide. En una modalidad, por ejemplo, las células placentarias que tienen forma fibroblastoide, expresan CD73 y CD105, y producen uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo, se aíslan de otras células placentarias. En otra modalidad, las células placentarias OCT-4 + que producen uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo se aíslan de otras células placentarias.

[00196] En otra modalidad, las células placentarias aisladas se pueden identificar y caracterizar mediante un ensayo unitario formador de colonias. Los ensayos unitarios formadores de colonias son comúnmente conocidos en la técnica, tales como medio MESENCULT™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Columbia Británica).

[00197] Las células placentarias aisladas pueden evaluarse en cuanto a su viabilidad, potencial de proliferación y longevidad utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como ensayo de exclusión de azul de tripano, ensayo de captación de diacetato de fluoresceína, ensayo de captación de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y ensayo de captación de timidina, ensayo de proliferación celular de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) (para evaluar la proliferación). La longevidad se puede determinar por métodos bien conocidos en la técnica, tal como determinando el número máximo de duplicación de población en un cultivo extendido.

[00198] Las células placentarias aisladas, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2 anterior, también se pueden separar de otras células placentarias usando otras técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células placentarias. 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-descongelación; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación a contracorriente); unidad de separación por gravedad; distribución en contracorriente; electroforesis; y similares.

5.3.6 Cèlulas Placentarias Estimuladas

[00199] También se proporcionan en la presente poblaciones de células placentarias aisladas, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2 anterior, que se han estimulado poniendo en contacto dichas células con una o más moléculas estimuladoras. En una modalidad específica, dicha célula o población de células (por ejemplo, PDACs) se estimula con una o más citoquinas. En otra modalidad específica, dicha célula o población de células (por ejemplo, PDACs) se estimula con una o más citoquinas proinflamatorias. En una modalidad específica, dicha una o más citocinas proinflamatorias se selecciona del grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α e INF- γ . En otra modalidad específica, la célula o población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimula con IL-1 α . En otra modalidad específica, la célula o población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimula con IL-1 β . En otra modalidad específica, la célula o población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimula con IL-6. En otra modalidad específica, la célula o población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimula con IL-8. En otra modalidad específica, la célula o población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimula con IL-18. En otra modalidad específica, la célula o población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimula con TNF- α . En otra modalidad específica, la célula o población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimula con INF- γ .

[00200] En una modalidad, la población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimula mediante una o más citocinas, en donde dicha citoquina está en una concentración de 1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml, 1.000 pg/ml, 10,000 pg/mL o 100,000 pg/mL. En una modalidad específica, dicho medio de cultivo se suplementa con dicha una o más citocinas a una concentración de 1 pg/ml a 10 pg/ml, 10 pg/ml a 100 pg/ml, 100 pg/ml a 1,000 pg/ml, 1,000 pg/mL a 10,000 pg/mL, o 10,000 pg/mL a 100,000 pg/mL.

[00201] En otra modalidad específica, la población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimula con una o más citoquinas, en donde dicha estimulación se produce durante 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 2 horas, 5 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, 45 horas, 50 horas, 55 horas o 60 horas. En otra modalidad específica, la población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimula con una o más citocinas, donde dicha estimulación se produce durante entre 1 minuto y 5 minutos, 5 minutos y 10 minutos, 10 minutos y 15 minutos, 15 minutos y 30 minutos, 30 minutos y 60 minutos, 60 minutos y 2 horas, 2 horas y 5 horas, 5 horas y 10 horas, 10 horas y 15 horas, 15 horas y 20 horas, 20 horas y 25 horas, 25 horas y 30 horas, 30 horas y 35 horas, 35 horas y 40 horas, 40 horas y 45 horas, 45 horas y 50 horas, 50 horas y 55 horas, o 55 horas a 60 horas.

[00202] En algunas modalidades, las PDACs estimuladas descritas en este documento (por ejemplo, PDACs estimuladas por IL-1 β) producen factores secretados a un nivel más elevado que las PDACs no estimuladas. En una modalidad específica, dichos factores secretados comprenden GM-CSF, G-CSF, IL-6, GRO, MCP-1, folistatina y/o IL-8. En modalidades específicas, dichas PDACs estimuladas descritas en este documento (por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β) tienen propiedades pro-angiogénicas.

[00203] En una modalidad específica, la población de células descrita en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimulan in vitro.

5.4 CULTIVO DE CÉLULAS PLACENTARIAS AISLADAS

5.4.1 Medios de Cultivo

[00204] Las células placentarias aisladas, o poblaciones de células placentarias aisladas, o células o tejido placentario del cual crecen las células placentarias, se pueden usar para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Generalmente, las células se transfieren a recipientes de cultivo tisular estériles, ya sea sin recubrimiento o recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, polilisina, CELLSTART™ y/o proteína de membrana extracelular. (por ejemplo, MATRIGEL® (BD Discovery Labware, Bedford, MA)), u otra biomolécula o agente mimético sintético adecuado.

[00205] Las células placentarias aisladas se pueden cultivar en cualquier medio, y bajo cualquier condición, reconocido en la técnica como aceptable para el cultivo de células, por ejemplo, células madre. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende suero. Las células placentarias aisladas se pueden cultivar en, por ejemplo, DMEM-LG (medio esencial modificado de Dulbecco, glucosa baja)/MCDB 201 (medio basal de fibroblastos de pollo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA + BSA (ácido linoleico- albúmina de suero bovino), ácido L-ascórbico dexametasona, PDGF, EGF, IGF-1 y penicilina/estreptomicina; DMEM-HG (alto en glucosa) que comprende suero bovino fetal al 10% (FBS); DMEM-HG que comprende FBS al 15%; IMDM (medio de Dulbecco modificado de Iscove) que comprende SFB al 10% , suero de caballo al 10% e hidrocortisona; M199 que comprende FBS al 1% a 20%, EGF y heparina; α-MEM (medio esencial mínimo) que comprende FBS al 10%, GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende FBS al 10%, GLUTAMAX™ y gentamicina, *etc.*

[00206] Otros medios que pueden usarse para cultivar células placentarias incluyen DMEM (alto o bajo en glucosa), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado de Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE.

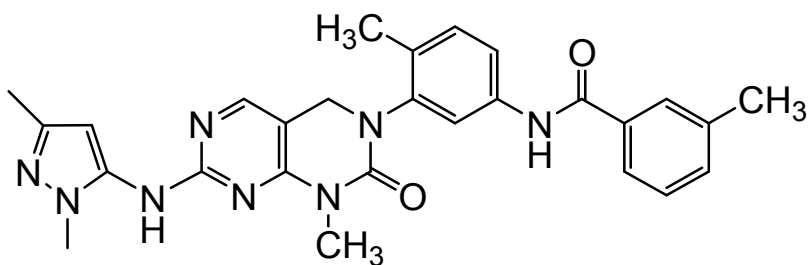
[00207] El medio de cultivo se puede complementar con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferiblemente aproximadamente 2-15% (v/v), suero equino (caballo) (ES), suero humano. (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferiblemente aproximadamente 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento tipo 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 estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, solos o en combinación.

[00208] Las células placentarias aisladas se pueden cultivar en condiciones estándar de cultivo tisular, por ejemplo, en placas de cultivo tisular o placas de múltiples pozos. Las células placentarias aisladas también se pueden cultivar usando un método de la gota colgante. En este método, las células placentarias aisladas se suspenden a aproximadamente 1×10^4 células por ml en aproximadamente 5 ml de medio, y una o más gotas del medio se colocan en el interior de la tapa de un recipiente de cultivo de tejidos, por ejemplo, un plato Petri de 100 mL. Las gotas pueden ser, por ejemplo, gotas únicas, o múltiples gotas de, por ejemplo, una pipeta multicanal. La tapa se invierte cuidadosamente y se coloca en la parte superior del fondo del plato, que contiene un volumen de líquido, ej., PBS estéril suficiente para mantener el contenido de humedad en la atmósfera del plato, y las células madre se cultivan.

[00209] En modalidades específicas, las células madre placentarias aisladas se cultivan en presencia de citoquinas proinflamatorias. El medio de cultivo que contiene citoquinas proinflamatorias puede ser cualquier medio, y bajo cualquier condición, reconocido en la técnica como aceptable para el cultivo de células, por ejemplo, células madre, que comprende adicionalmente una o más citoquinas proinflamatorias. En una modalidad específica, dichas citoquinas proinflamatorias comprenden una o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , y/o INF- γ . En otra modalidad específica, dicha citocina proinflamatoria es IL-1 β .

[00210] Las citoquinas proinflamatorias pueden suplementarse al medio de cultivo a cualquier concentración reconocida en la técnica como aceptable. En una modalidad específica, dicho medio de cultivo se suplementa con dicha una o más citocinas a una concentración de 1 pg/mL, 10 pg/mL, 100 pg/mL, 1,000 pg/mL, 10,000 pg/mL, o 100,000 pg/mL. En una modalidad específica, dicho medio de cultivo se suplementa con dicha una o más citocinas a una concentración de 1 pg/ml a 10 pg/ml, 10 pg/ml a 100 pg/ml, 100 pg/ml a 1,000 pg/ml, 1,000 pg/mL a 10,000 pg/mL, o 10,000 pg/mL a 100,000 pg/mL.

[00211] En una modalidad, las células placentarias aisladas se cultivan en presencia de un compuesto que actúa para mantener un fenotipo indiferenciado en las células placentarias aisladas. En una modalidad específica, el compuesto es una 3,4-dihidropiridimol [4,5-d] pirimidina sustituida. En otra modalidad específica, el compuesto es un compuesto que tiene la siguiente estructura química:



[00212] El compuesto se puede poner en contacto con células placentarias aisladas, o una población de células placentarias aisladas, a una concentración de, por ejemplo, entre aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 10 μ M.

5.4.2 Expansión y Proliferación de Células Placentarias

[00213] Una vez que una célula placentaria aislada o población de células placentarias aisladas (por ejemplo, una célula placentaria o una población de células placentarias separadas de al menos el 50% de las células placentarias con las cuales la célula madre o población de células madre se asocia normalmente in vivo), la célula o población de células puede proliferarse y expandirse in vitro. Por ejemplo, una población de las células placentarias aisladas puede cultivarse en recipientes de cultivo tisular, por ejemplo, platos, matraces, placas de múltiples pozos, o similares, durante

un tiempo suficiente para que las células proliferen hasta una confluencia del 70-90%, es decir, hasta que las células y su progenie ocupen del 70 al 90% del área de superficie de cultivo del recipiente de cultivo tisular.

[00214] Las células placentarias aisladas se pueden sembrar en recipientes de

5 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 o más células/cm²). En una modalidad preferida, las células se cultivan en presencia de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO²
10 en aire. En algunas modalidades preferidas, las células se cultivan entre 2 y 25% aproximadamente de O² en aire, preferiblemente entre 5 y 20% aproximadamente de O² en aire. Las células preferiblemente se cultivan entre 25 °C y 40 °C aproximadamente, preferiblemente a 37 °C. Las células se cultivan preferiblemente en una incubadora. El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, usando
15 un biorreactor. Las células placentarias, por ejemplo, células madre placentarias o células multipotentes placentarias, preferiblemente se cultivan bajo estrés oxidativo mínimo (por ejemplo, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína o similares).

[00215] Una vez que se obtiene una confluencia de menos del 100%, por ejemplo,

20 se obtiene del 70% al 90%, las células pueden pasarse. Por ejemplo, las células pueden tratarse enzimáticamente, por ejemplo, tripsinizadas, usando técnicas bien conocidas en la técnica, para separarlas de la superficie del cultivo de tejidos. Después de eliminar las células pipeteando y contando las células, se pasan de 10.000 a 100.000 células/cm² a un nuevo recipiente de cultivo que contiene medio de cultivo
25 nuevo. Típicamente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del que se extrajeron las células placentarias aisladas. Las células placentarias aisladas pueden pasarse, al menos, o no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces o más .

5.4.3 Poblaciones de Células Placentarias Aisladas

[00216] También se proporcionan en la presente poblaciones de células

30 placentarias aisladas, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2 anterior, por ejemplo las células placentarias aisladas usadas para

generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, que son útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente. Las poblaciones de células placentarias aisladas utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente se pueden aislar directamente de una o más placentas; es decir, la población celular

5 puede ser una población de células placentarias que comprende las células placentarias aisladas, en donde las células placentarias aisladas se obtienen de, o están contenidas dentro, perfundidas, u obtenidas de, o contenidas dentro del tejido placentario roto, por ejemplo, digestato de tejido placentario (es decir, la colección de células obtenidas por digestión enzimática de una placenta o parte de la misma). Las

10 células placentarias aisladas usadas para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente también se pueden cultivar y expandir para producir poblaciones de las células placentarias aisladas. Las poblaciones de células placentarias que comprenden las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente también se pueden cultivar y expandir para

15 producir poblaciones de células placentarias. En una modalidad, las células placentarias aisladas descritas en este documento se estimulan con una o más citoquinas proinflamatorias. En una modalidad específica, dichas citoquinas proinflamatorias comprenden uno o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α y INF- γ . En una modalidad específica, dicha citocina proinflamatoria es IL-1 β .

20 **[00217]** Las poblaciones de células placentarias útiles en los métodos de tratamiento proporcionados en este documento comprenden las células placentarias aisladas, por ejemplo, las células placentarias aisladas como se describe en la Sección 5.4.2 de este documento. En una modalidad específica, dichas poblaciones de células placentarias comprenden las PDACs, por ejemplo, las PDACs estimuladas con IL-1 β .

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

30 **[00218]** Las poblaciones de células placentarias aisladas útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente se pueden producir, por ejemplo,

seleccionando células placentarias aisladas, derivadas de digestión enzimática o perfusión, que expresan marcadores particulares y/o un cultivo particular o características morfológicas. En una modalidad, por ejemplo, en la presente se proporciona un método para producir una población celular seleccionando células

5 placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD200 y carecen de expresión de HLA-G; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, se produce una población celular seleccionando células placentarias que expresan CD200 y carecen de expresión de HLA-G, y aislando dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, se

10 produce una población celular seleccionando células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73, CD105 y CD200; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, se produce una población celular identificando células placentarias que expresan CD73, CD105 y CD200, y aislando dichas células de otras células para formar una población celular.

15 En otra modalidad, se produce una población celular seleccionando células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD200 y OCT-4; y aislando dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, se produce una población celular seleccionando células placentarias que expresan CD200 y OCT-4, y aislando dichas células de otras células para formar una

20 población celular. En otra modalidad, se produce una población celular seleccionando células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de placenta células que comprenden dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embrioide; y aislando

25 dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, se produce una población celular seleccionando células placentarias que expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende dichas células madres cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo

30 embrioide, y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, se produce una población celular seleccionando células

placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73 y CD105, y carecen de expresión de HLA-G; y se aíslan dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, se produce una población celular seleccionando células placentarias que expresan CD73 y CD105 y carecen de expresión de HLA-G, y aislando dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, 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 embrioide en una población de células placentarias que comprenden dichas células madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embrioide; y aislando dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, se produce una población celular seleccionando células placentarias que expresan OCT-4, y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten para la formación de un cuerpo de tipo embrioide, y aislando dichas células de otras células para formar una población celular.

[00219] En otra modalidad, una población celular, por ejemplo, una población celular utilizada para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente, se produce seleccionando células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD10 y CD105, y no expresan CD34; y aislando dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, se produce una población celular seleccionando células placentarias que expresan CD10 y CD105, y no expresan CD34, y aislando dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, una población celular, por ejemplo, una población celular utilizada para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, se produce seleccionando células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD10, CD105 y CD200, y no expresan CD34; y aislando dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad, se produce una población celular seleccionando células placentarias que expresan CD10, CD105 y CD200, y no expresan CD34, y aislando dichas células de otras células

para formar una población celular. En otra modalidad específica, una población celular, por ejemplo, una población celular utilizada para generar las PDAC estimuladas descritas en la presente, se producen seleccionando células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD10, CD90, CD105 y CD200. y no expresan CD34 y CD45; y aislando dichas células de otras células para formar una población celular. En otra modalidad específica, una población celular, por ejemplo, una población celular utilizada para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, se produce seleccionando células placentarias que expresan CD10, CD90, CD105 y CD200, y no expresan CD34 y CD45, y aislando dichas células de otras células para formar una población celular.

[00220] La selección de poblaciones celulares que comprenden células placentarias que tienen cualquiera de las combinaciones de marcadores descritas en la Sección 5.2.2 anterior, puede aislarse u obtenerse de manera similar.

[00221] En cualquiera de las modalidades anteriores, la selección de las poblaciones celulares aisladas puede comprender adicionalmente seleccionar células placentarias que expresan ABC-p (una proteína transportadora ABC específica a placenta, véase, por ejemplo, Allikmets y col., Cancer Res. 58 (23): 5337 - 9 (1998)). El método también puede comprender seleccionar células que presenten al menos una característica específica de, por ejemplo, una célula madre mesenquimal, por ejemplo, expresión de CD44, expresión de CD90 o expresión de una combinación de los anteriores.

[00222] En las modalidades anteriores, el sustrato puede ser cualquier superficie sobre la que se pueda realizar el cultivo y/o la selección de células, por ejemplo, células placentarias aisladas. Típicamente, el sustrato es plástico, por ejemplo, plato de cultivo tisular o plástico de placa multipozo. El plástico de cultivo tisular se puede recubrir con una biomolécula, por ejemplo, laminina o fibronectina.

[00223] Las células, por ejemplo, las células placentarias aisladas usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en este documento, se pueden seleccionar para una población de células placentarias por cualquier medio conocido en la técnica de la selección celular. Por ejemplo, las células pueden seleccionarse usando un anticuerpo o anticuerpos contra 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. Los anticuerpos que son específicos para ciertos marcadores relacionados con células madre son conocidos en la técnica. 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. Los anticuerpos contra otros marcadores también están disponibles comercialmente, por ejemplo, CD34, CD38 y CD45 están disponibles en, por ejemplo, StemCell Technologies o BioDesign International.

[00224] Las poblaciones aisladas de células placentarias utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente pueden comprender células placentarias que no son células madre, o células que no son células placentarias.

[00225] Las poblaciones de células aisladas que comprenden células adherentes derivadas de placenta utilizadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente pueden comprender un segundo tipo de célula, por ejemplo, células placentarias que no son células adherentes derivadas de placenta, o, por ejemplo, células que no son células placentarias. Por ejemplo, una población aislada de células adherentes derivadas de placenta puede comprender, por ejemplo, se puede combinar con, una población de un segundo tipo de células, en donde dicho segundo tipo de células son, por ejemplo, células madre embrionarias, células sanguíneas (por ejemplo, sangre placentaria, células sanguíneas placentarias, sangre del cordón umbilical, células sanguíneas del cordón umbilical, sangre periférica, células sanguíneas periféricas, células nucleadas de la sangre de la placenta, sangre del cordón umbilical o sangre periférica, etc.), células madre aisladas de la sangre (ej., células madre aisladas de sangre de placenta, sangre de cordón umbilical o sangre periférica), células nucleadas de perfundido placentario, por ejemplo, células nucleadas totales de perfundido placentario; células madre del cordón umbilical, poblaciones de células nucleadas derivadas de la sangre, células del estroma mesenquimal derivadas de médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, células madre hematopoyéticas derivadas de la médula ósea, médula ósea en bruto, células madre adultas (somáticas), poblaciones de células madre contenidas dentro de tejido, células cultivadas, por ejemplo, células madre cultivadas, poblaciones de células

completamente diferenciadas (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células musculares, células cardíacas, etc.), pericitos y similares. En una modalidad específica, una población de células que comprende células adherentes derivadas de placenta comprende células madre placentarias o células madre de cordón umbilical. En ciertas modalidades en las que el segundo tipo de célula es sangre o células sanguíneas, los eritrocitos se han eliminado de la población de células.

[00226] En una modalidad específica, el segundo tipo de célula es una célula madre hematopoyética. Dichas células madre hematopoyéticas pueden estar, por ejemplo, contenidas dentro de sangre placentaria, sangre de cordón umbilical o sangre periférica no procesada; en células nucleadas totales de sangre de placenta, sangre de cordón umbilical o sangre periférica; en una población aislada de células CD34 + de sangre placentaria, sangre de cordón umbilical o sangre periférica; en médula ósea no procesada; en células nucleadas totales de médula ósea; en una población aislada de células CD34 + de médula ósea, o similares.

[00227] En otra modalidad, una población aislada de células adherentes derivadas de placenta usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente se combina con una pluralidad de células adultas o progenitoras del sistema vascular. En diversas modalidades, las células son células endoteliales, células progenitoras endoteliales, miocitos, cardiomiocitos, pericitos, angioblastos, mioblastos o cardiomioblastos.

[00228] En otra modalidad, el segundo tipo de célula es un tipo de célula no embrionaria manipulada en cultivo con el fin de expresar marcadores de pluripotencia y funciones asociadas con células madre embrionarias.

[00229] En modalidades específicas de las poblaciones aisladas anteriores de células adherentes derivadas de placenta usadas para generar las PDACs estimuladas descritas en la presente, una o ambas células adherentes derivadas de placenta y células de un segundo tipo son autólogas, o son alogénicas, a un receptor pretendido de las células.

[00230] En otra modalidad específica, la composición comprende células adherentes derivadas de placenta y células madre embrionarias. En otra modalidad

específica, la composición comprende células adherentes derivadas de placenta y células madre estromales o mesenquimales, por ejemplo, células madre o estromales mesenquimatosas derivadas de médula ósea. En otra modalidad específica, la composición comprende células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea.

- 5 En otra modalidad específica, la composición comprende células adherentes derivadas de placenta y células progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea, sangre fetal, sangre de cordón umbilical, sangre placentaria y/o sangre periférica. En otra modalidad específica, la composición comprende células adherentes derivadas de placenta y células madre somáticas. En
- 10 una modalidad más específica, dicha célula madre somática es una célula madre neural, una célula madre hepática, una célula madre pancreática, una célula madre endotelial, una célula madre cardíaca o una célula madre muscular.

- [00231]** En otras modalidades específicas, el segundo tipo de células comprende aproximadamente, al menos, o no más de, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%,
- 15 45% o 50% de células en dicha población. En otras modalidades específicas, las PDAC en dicha composición comprenden al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% de células en dicha composición. En otras modalidades específicas, las células adherentes derivadas de placenta comprenden aproximadamente, al menos, o no más de, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% o 45% de células en dicha
- 20 población.

- [00232]** Las células en una población aislada de células adherentes derivadas de placenta se pueden combinar con una pluralidad de células de otro tipo, por ejemplo, con una población de células madre, en una proporción de aproximadamente
- 25 100,000,000:1, 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
- 30 nucleadas totales en cada población. Las células en una población aislada de células

adherentes derivadas de placenta se pueden combinar también con una pluralidad de células de una pluralidad de tipos de células.

[00233] En otras modalidades, una población de las células placentarias descritas en la presente, por ejemplo, las PDAC descritas anteriormente, se combinan con

5 células adherentes placentarias osteogénicas (OPAC), por ejemplo, las OPAC descritas en la Solicitud de Patente No. 12/546.556, presentada el 24 de agosto de 2009. , titulado "Métodos y composiciones para el tratamiento de defectos óseos con células madre placentarias", o combinado con células angiogénicas derivadas de amnios (AMDACs), por ejemplo, los AMDAC descritos en la Solicitud de Patente de
10 Estados Unidos N° 12/622.352, titulada "Células angiogénicas derivadas de amnios", cuya divulgación se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

[00234] En una modalidad, las células placentarias aisladas descritas en este documento (por ejemplo, PDACs) se estimulan con una o más citoquinas

proinflamatorias. En una modalidad específica, dichas citocinas proinflamatorias
15 comprenden uno o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α y INF- γ . En una modalidad específica, dicha citocina proinflamatoria es IL-1 β .

5.5 PRODUCCIÓN DE UN BANCO DE CÉLULAS PLACENTARIAS

[00235] Las células aisladas de placenta posparto, por ejemplo, las células

20 placentarias aisladas descritas en la Sección 5.2.2 anterior, pueden cultivarse de diferentes maneras para producir un conjunto de lotes, por ejemplo, en donde un lote es un conjunto de dosis administrables individualmente, de células placentarias aisladas. Tales lotes pueden, por ejemplo, obtenerse a partir de células de perfundido placentario o de células de tejido placentario digerido con enzimas. Los conjuntos de
25 lotes de células placentarias, obtenidos a partir de una pluralidad de placentas, se pueden disponer en un banco de células placentarias aisladas para, por ejemplo, almacenamiento a largo plazo. En general, las células placentarias adherentes al plástico de cultivo de tejidos se obtienen a partir de un cultivo inicial de material placentario para formar un cultivo de siembra, que se expande en condiciones
30 controladas para formar poblaciones de células a partir de cantidades

aproximadamente equivalentes de duplicaciones. Los lotes se derivan preferiblemente del tejido de una sola placenta, pero se pueden derivar del tejido de una pluralidad de placentas.

[00236] En una modalidad, los lotes de células placentarias se obtienen de la

5 siguiente manera. El tejido de la placenta se rompe primero, por ejemplo, mediante picadura, se digiere con una enzima adecuada, por ejemplo, tripsina o colagenasa (ver la Sección 5.3.3, anterior). El tejido placentario preferiblemente comprende, por ejemplo, el amnios completo, el corion completo, o ambos, a partir de una sola placenta, pero puede comprender solo una parte del amnios o corion. El tejido digerido
10 se cultiva, por ejemplo, durante aproximadamente 1-3 semanas, preferiblemente aproximadamente 2 semanas. Después de la eliminación de las células no adherentes, se recogen las colonias de alta densidad que se forman, por ejemplo, por tripsinización. Estas células se recogen y resuspenden en un volumen conveniente de medio de cultivo, y luego se usan para sembrar cultivos de expansión. Los cultivos de expansión
15 pueden estar en cualquier disposición de aparatos de cultivo celular separados, por ejemplo, Cell Factory de NUNC™. Las células pueden subdividirse 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 , o 10×10^4 células/cm². Preferiblemente, se usan de
20 aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^4 células/cm² para sembrar cada cultivo de expansión. El número de cultivos de expansión puede ser mayor o menor en número dependiendo de la (s) placenta (s) particular (es) de donde se obtienen las células.

[00237] Los cultivos de expansión se hacen crecer hasta que la densidad de las

25 células en cultivo alcanza un cierto valor, por ejemplo, aproximadamente 1×10^5 células/cm². Las células se pueden recoger y crioconservar en este punto, o pasar a nuevos cultivos de expansión como se describió anteriormente. Las células pueden pasarse, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces antes de su uso. Se mantiene preferiblemente un registro del número
30 acumulado de duplicaciones de población durante los cultivos de expansión. Las células de un cultivo pueden expandirse para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20,

22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 , 36, 38 o 40 duplicaciones, o hasta 60 duplicaciones. Preferiblemente, sin embargo, el número de duplicaciones de población, antes de dividir la población de células en dosis individuales, es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30. Las células pueden cultivarse continuamente durante todo el proceso de expansión, o pueden congelarse en uno o más puntos durante la expansión.

[00238] Las células a usar para dosis individuales pueden congelarse, por ejemplo, criopreservarse para un uso posterior. Las dosis individuales pueden comprender, por ejemplo, entre 1 millón y 50 millones aproximadamente de células por ml, y pueden comprender entre 10^6 y 10^{10} células aproximadamente en total.

[00239] En una modalidad, por lo tanto, un banco de células placentarias puede prepararse mediante un método que comprende: expandir las células placentarias de cultivo primario de una placenta postparto humana para una primera pluralidad de duplicaciones de población; criopreservar dichas células placentarias para formar un Banco Maestro de Células; expandir una pluralidad de células placentarias del Banco de Células Maestro para una segunda pluralidad de duplicaciones de población; criopreservar dichas células placentarias para formar un Banco de Células de Trabajo; expandir una pluralidad de células placentarias del Banco de Células de Trabajo para una tercera pluralidad de duplicaciones de población; y criopreservar dichas células placentarias en dosis individuales, en las que dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células placentarias. Opcionalmente, una pluralidad de células placentarias de dicha tercera pluralidad de duplicaciones de población puede expandirse para una cuarta pluralidad de duplicaciones de poblaciones y criopreservarse en dosis individuales, donde dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células placentarias.

[00240] En otra modalidad específica, dichas células placentarias de cultivo primario comprenden células placentarias a partir de perfundido placentario. En otra modalidad específica, dichas células placentarias de cultivo primario comprenden células placentarias a partir de tejido placentario digerido. En otra modalidad específica, dichas células placentarias de cultivo primario comprenden células placentarias a partir de perfundido placentario y de tejido placentario digerido. En otra

modalidad específica, todas estas células placentarias en dicho cultivo primario de células placentarias son de la misma placenta. En otra modalidad específica, el método comprende además la etapa de seleccionar células placentarias CD200⁺ o HLA-G⁻ de dicha pluralidad de dichas células placentarias de dicho Banco de Células de Trabajo para formar dosis individuales. En otra modalidad específica, dichas dosis individuales comprenden entre 10⁴ y 10⁵ aproximadamente células placentarias. En otra modalidad específica, dichas dosis individuales comprenden entre 10⁵ y 10⁶ aproximadamente células placentarias. En otra modalidad específica, dichas dosis individuales comprenden entre 10⁶ y 10⁷ aproximadamente células placentarias. En otra modalidad específica, dichas dosis individuales comprenden entre 10⁷ y 10⁸ aproximadamente células placentarias. En otra modalidad específica, dichas dosis individuales comprenden entre 10⁸ y 10⁹ aproximadamente células placentarias. En otra modalidad específica, dichas dosis individuales comprenden entre 10⁹ y 10¹⁰ aproximadamente células placentarias.

15 **[00241]** En una modalidad 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 positivo para un patógeno probado, se descarta todo el lote de la placenta. Tal prueba puede realizarse en cualquier momento durante la producción de lotes de células placentarias, por ejemplo, durante el cultivo de expansión. Los 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.

20 **[00242]** En una modalidad, las células madre placentarias depositadas de acuerdo con los métodos descritos en este documento se estimulan con una o más citoquinas proinflamatorias antes del depósito. En una modalidad específica, dichas citocinas proinflamatorias comprenden uno o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α y INF- γ . En una modalidad específica, dicha citocina proinflamatoria es IL-1 β .

5.6 PRESERVACIÓN DE CÉLULAS PLACENTARIAS

30 **[00243]** Las células placentarias aisladas, por ejemplo, las células placentarias aisladas descritas en la Sección 5.3.2, pueden conservarse, es decir, colocarse en

condiciones que permitan un almacenamiento a largo plazo o condiciones que inhiben la muerte celular mediante, por ejemplo, apoptosis o necrosis.

[00244] Las células placentarias pueden conservarse usando, por ejemplo, una composición que comprende un inhibidor de la apoptosis, un inhibidor de la necrosis

5 y/o un perfluorocarbono que lleva oxígeno, como se describe en la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos relacionada N° 2007/0190042, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. En una modalidad, un método para conservar una población de células, útil en los métodos y composiciones descritos en la presente, comprende poner en contacto dicha población de células con

10 una composición de colección de células que comprende un inhibidor de apoptosis y un perfluorocarbono portador de oxígeno, donde dicho inhibidor de apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células, en comparación con una población de células no contactadas con el inhibidor de la apoptosis. En una modalidad específica, dicho

15 inhibidor de apoptosis es un inhibidor de la caspasa. En otra modalidad específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de JNK. En otra modalidad específica, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación o proliferación de dichas células. En otra modalidad, dicha composición de colección de células comprende dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en fases

20 separadas. En otra modalidad, dicha composición de colección de células comprende dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en una emulsión. En otra modalidad, la composición de colección de células comprende adicionalmente un emulsionante, por ejemplo, lecitina. En otra modalidad, dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre 0 °C y 25 °C

25 aproximadamente en el momento de hacer contacto con las células. En otra modalidad específica, dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre 2 °C y 10 °C aproximadamente, o entre 2 °C y 5 °C aproximadamente, en el momento de hacer contacto con las células. En otra modalidad específica, dicho contacto se realiza durante el transporte de dicha población de células. En otra modalidad específica,

30 dicho contacto se realiza durante la congelación y descongelación de dicha población de células.

[00245] Las poblaciones de células placentarias pueden conservarse, por ejemplo, mediante un método que comprende poner en contacto dicha población de células con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto conservador de órganos, donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir apoptosis en la población de células, en comparación con una población de células no contactadas con el inhibidor de la apoptosis. En una modalidad específica, el compuesto que preserva órganos es una solución UW (descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 4.798.824, también conocida como ViaSpan; véase también Southard, Transplantation 49 (2): 251-257 (1990)) o una solución descrita en Stern, Patente de Estados Unidos No. 5.552.267, cuyas descripciones se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. En otra modalidad, dicho compuesto conservador de órganos es almidón de hidroxietilo, ácido lactobiónico, rafinosa o una combinación de los mismos. En otra modalidad, la composición de colección de células comprende adicionalmente un perfluorocarbono portador de oxígeno, en dos fases o como una emulsión.

[00246] En otra modalidad del método, las células placentarias se ponen en contacto con una composición de colección de células que comprende un inhibidor de apoptosis y un perfluorocarbono portador de oxígeno, un compuesto conservante de órganos, o una combinación de los mismos, durante la perfusión. En otra modalidad, dichas células se ponen en contacto durante un proceso de ruptura de tejido, por ejemplo, digestión enzimática. En otra modalidad, las células placentarias se ponen en contacto con dicho compuesto de recogida de células después de la recogida por perfusión, o después de la recogida por disrupción de tejidos, por ejemplo, digestión enzimática.

[00247] Típicamente, durante la recolección de células placentarias, el enriquecimiento y el aislamiento, es preferible minimizar o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y el estrés mecánico. En otra modalidad del método, por lo tanto, una célula, o población de células, está expuesta a un estado hipóxico durante la recolección, enriquecimiento o aislamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, en donde una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración normal de oxígeno en la sangre. En otra modalidad

específica, dicha población de células está expuesta a dicha condición hipóxica durante menos de dos horas durante dicha conservación. En otra modalidad específica, dicha población de células está expuesta a dicha condición hipóxica durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no está expuesta a un estado hipóxico, durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento. En otra modalidad específica, dicha población de células no está expuesta a estrés por cizalladura durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento.

[00248] Las células placentarias se pueden crioconservar, por ejemplo, en un medio de crioconservación en recipientes pequeños, 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 de células, por ejemplo medio de congelación de células comercialmente disponible, por ejemplo, C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de crioconservación preferiblemente comprende DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración entre 2% y 15% (v/v), por ejemplo, aproximadamente 10% (v/v). El medio de crioconservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las células placentarias se enfrían preferiblemente a aproximadamente 1°C/min durante la crioconservación. Una temperatura de crioconservación preferida es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, preferiblemente de aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C. Las células crioconservadas se pueden transferir a nitrógeno líquido antes de descongelarlas para su uso. En algunas modalidades, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. La crioconservación también se puede hacer usando un congelador de tasa controlada. Las células crioconservadas preferiblemente se descongelan a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

[00249] En una modalidad, las células madre placentarias crioconservadas de acuerdo con los métodos descritos en este documento se estimulan con una o más citocinas proinflamatorias antes de la crioconservación. En modalidades específicas,

las citocinas proinflamatorias comprenden uno o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α e INF- γ . En una modalidad específica, dicha citocina proinflamatoria es IL-1 β .

5.7 COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CÉLULAS PLACENTARIAS AISLADAS

- 5 **[00250]** Las células placentarias estimuladas descritas en este documento, por ejemplo, en la Sección 5.3.6, pueden combinarse con cualquier compuesto, composición o dispositivo fisiológicamente aceptable o medicamento aceptable para uso en los métodos y composiciones descritos en este documento. Las composiciones útiles en los métodos de tratamiento proporcionados en este documento pueden
- 10 comprender cualquiera o más células placentarias estimuladas descritas en este documento (véase la Sección 5.3.6, anterior). En ciertas modalidades, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una composición que comprende células placentarias estimuladas en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 **[00251]** En ciertas modalidades, una composición que comprende las células placentarias aisladas estimuladas comprende adicionalmente una matriz, por ejemplo, una matriz descelularizada o una matriz sintética. En otra modalidad específica, dicha matriz es un armazón tridimensional. En otra modalidad específica, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina o vitronectina.
- 20 En otra modalidad específica, la matriz es una membrana amniótica o un biomaterial derivado de una membrana amniótica. En otra modalidad específica, dicha matriz comprende una proteína de membrana extracelular. En otra modalidad específica, dicha matriz comprende un compuesto sintético. En otra modalidad específica, dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otra modalidad específica, dicho
- 25 compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, citocina, anticuerpo o molécula orgánica de menos de 5.000 daltons.
- [00252]** En otra modalidad, una composición útil en los métodos de tratamiento proporcionados en este documento comprende un medio acondicionado por cualquiera de las células placentarias anteriores, o cualquiera de las poblaciones de células
- 30 placentarias anteriores.

5.7.1 Células Placentarias Aisladas Criopreservadas

[00253] Las poblaciones aisladas de células placentarias útiles en los métodos y

composiciones descritos en este documento pueden conservarse, por ejemplo,

crioconservarse para un uso posterior. Los métodos para la crioconservación de

5 células, tales como células madre, son bien conocidos en la técnica. Las poblaciones

de células placentarias aisladas pueden ser preparadas en una forma que se puede

administrar fácilmente a un individuo, por ejemplo, una población aislada de células

placentarias que está contenida dentro de un recipiente que es adecuado para uso

médico. Tal recipiente puede ser, por ejemplo, una jeringa, una bolsa de plástico

10 estéril, un matraz, una jarra u otro recipiente a partir del cual se puede dispensar

fácilmente la población aislada de células placentarias. Por ejemplo, el recipiente

puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico, médicamente aceptable,

adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El

contenedor, en ciertas modalidades, es uno que permite la crioconservación de la

15 población celular combinada.

[00254] En una modalidad, las células madre placentarias crioconservadas de

acuerdo con los métodos descritos en este documento se estimulan con una o más

citocinas proinflamatorias antes de la crioconservación. En otra modalidad, dichas

células madre placentarias se estimulan con una o más citocinas proinflamatorias

20 después de descongelar dichas células madre placentarias criopreservadas. En

modalidades específicas, las citocinas proinflamatorias comprenden uno o más de IL-1

α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α e INF- γ . En una modalidad específica, dicha citocina

proinflamatoria es IL-1 β .

[00255] La población de células placentarias aisladas crioconservadas puede

25 comprender células placentarias aisladas derivadas de un solo donante, o de múltiples

donantes. La población aislada de células placentarias puede ser completamente

compatible con HLA para un destinatario previsto, o parcial o completamente no

coincidente HLA.

[00256] Por lo tanto, en una modalidad, se pueden usar células placentarias

30 aisladas en los métodos y se describen en este documento en forma de una

composición que comprende una población de células placentarias adherentes al

plástico de cultivo tisular en un recipiente. En una modalidad específica, las células placentarias aisladas se crioconservan. En otra modalidad específica, el contenedor es una bolsa, matraz o jarra. En otra modalidad específica, dicha bolsa es una bolsa estéril de plástico. En otra modalidad específica, dicha bolsa es adecuada, permite o
5 facilita la administración intravenosa de dicha población aislada de células placentarias, por ejemplo, mediante infusión intravenosa. La bolsa puede comprender múltiples lúmenes o compartimentos que están interconectados para permitir la mezcla de las células placentarias aisladas y una o más de otras soluciones, por ejemplo, un fármaco, antes o durante la administración. En otra modalidad específica, la composición
10 comprende uno o más compuestos que facilitan la crioconservación de la población celular combinada. En otra modalidad específica, dicha población aislada de células placentarias está contenida dentro de una solución acuosa fisiológicamente aceptable. En otra modalidad específica, dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable es una solución de NaCl al 0,9%. En otra modalidad específica, dicha población aislada de
15 células placentarias comprende células placentarias que son HLA compatibles con un receptor de dicha población celular. En otra modalidad específica, dicha población de células combinadas comprende células placentarias que son al menos parcialmente HLA no coincidentes con un receptor de dicha población celular. En otra modalidad específica, dichas células placentarias aisladas se derivan de una pluralidad de
20 donantes.

[00257] En ciertas modalidades, las células placentarias aisladas en el recipiente son células placentarias aisladas CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, en donde dichas células se han crioconservado, y están contenidas dentro de un recipiente. En una modalidad específica, dichas células placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ también son CD200⁺.
25 En otra modalidad específica, dichas células placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ también son CD45⁻ o CD90⁺. En otra modalidad específica, dichas células placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ también son CD45⁻ y CD90⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son además, una o más de CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻,
30 CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{dim}, 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 cualquier combinación de los mismos. En otra modalidad específica, las células placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻,
- 5 CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherinadim, 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)⁺.
- 10 **[00258]** En ciertas otras modalidades, las células placentarias aisladas citadas anteriormente son células aisladas placentarias CD200⁺, HLA-G⁻, en donde dichas células se han crioconservado, y están contenidas dentro de un recipiente. En otra modalidad, las células placentarias aisladas son células CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ que han sido crioconservadas, y están contenidas dentro de un contenedor. En otra
- 15 modalidad, las células placentarias aisladas son células madre CD200⁺, OCT-4⁺ que han sido crioconservadas, y están contenidas dentro de un contenedor. En otra modalidad, las células placentarias aisladas son células CD73⁺, CD105⁺ que han sido crioconservadas, y están contenidas dentro de un contenedor, y en donde dichas células placentarias aisladas facilitar la formación de uno o más cuerpos de tipo
- 20 embrioide cuando se cultivan con una población de células placentarias en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otra modalidad, las células placentarias aisladas son células CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ que han sido crioconservadas, y están contenidas dentro de un contenedor. En otra modalidad, las células placentarias aisladas son células placentarias OCT-4⁺ que se han
- 25 crioconservado, y están contenidas dentro de un recipiente, y en donde dichas células facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan con una población de células placentarias en condiciones que permiten la formación de cuerpos tipo embrioide.
- [00259]** En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas citadas
- 30 anteriormente son células madre placentarias o células multipotentes placentarias que son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ según se detecta mediante citometría de flujo (por

ejemplo, PDACs). En otra modalidad específica, las células placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo neural, células de un fenotipo osteogénico o células de un fenotipo condrogénico. En otra modalidad específica, las células placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas son adicionalmente CD200⁺. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD90⁺ o CD45⁻, como se detecta mediante citometría de flujo. En otra modalidad específica, las células placentarias aisladas CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son adicionalmente CD90⁺ o CD45⁻, como se detecta mediante citometría de flujo. En otra modalidad específica, las células placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente CD90⁺ o CD45⁻, como se detecta mediante citometría de flujo. En otra modalidad específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son adicionalmente CD90⁺ y CD45⁻, como se detecta mediante citometría de flujo. En otra modalidad específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD90⁺, CD45⁻ son adicionalmente CD80⁻ y CD86⁻, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra modalidad específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son adicionalmente una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, CD80⁻, CD86⁻, SH3⁺ o SH4⁺. En otra modalidad específica, las células son adicionalmente CD44⁺. En una modalidad específica de cualquiera de las células placentarias CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas anteriores, las células son adicionalmente una o más de CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A, B, C⁺, HLA-DP, DQ, DR⁻ y/o PDL1⁺.

[00260] En una modalidad específica de cualquiera de las anteriores células placentarias criopreservadas, dicho contenedor es una bolsa. En diversas modalidades específicas, dicho contenedor comprende aproximadamente, al menos, o como máximo 1x10⁶ de dichascélulas placentarias aisladas, 5x10⁶ de dichascélulas placentarias aisladas, 1x10⁷ de dichascélulas placentarias aisladas, 5x10⁷ de dichascélulas placentarias aisladas, 1x10⁸ de dichascélulas placentarias aisladas, 5x10⁸ de dichascélulas placentarias aisladas, 1x10⁹ de dichascélulas placentarias aisladas, 5x10⁹ de dichascélulas placentarias aisladas, 1x10¹⁰ de dcihascélulas placentarias aisladas o 1x10¹⁰ de dichascélulas placentarias aisladas. En otras modalidades específicas de cualquiera de las poblaciones criopreservadas anteriores,

dichas células placentarias aisladas han sido pasadas por lo menos, o no más de 5 veces, no más de 10 veces, no más de 15 veces, o no más de 20 veces. En otra modalidad específica de cualquiera de las anteriores células placentarias aisladas criopreservadas, dichas células placentarias aisladas se han expandido dentro de dicho contenedor.

[00261] En ciertas modalidades, una única dosis unitaria de células adherentes derivadas de placenta puede comprender, en diversas modalidades, aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células adherentes derivadas de la placenta. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento comprenden poblaciones de células adherentes derivadas de placenta, que comprenden 50% de células viables o más (es decir, al menos 50% de las células en la población son funcionales o están vivas). Preferiblemente, al menos el 60% de las células en la población son viables. Más preferiblemente, al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las células en la población en la composición farmacéutica son viables.

5.7.2 Células Placentarias Genéticamente Modificadas

[00262] Se proporcionan adicionalmente en la presente células placentarias, por ejemplo, cualquiera de las células placentarias multipotentes o células placentarias descritas en las Secciones 5.2.2 y 5.3.6 anteriores, o composiciones farmacéuticas que comprenden dichas células placentarias, en donde las células placentarias han sido genéticamente modificadas para producir citoquinas recombinantes o exógenas asociadas con, o que promueven la angiogénesis. En ciertas modalidades, dichas proteínas que facilitan la angiogénesis son uno o más de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, VEGFD), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, FGF2), angiogenina (ANG), factor de crecimiento epidérmico (EGF), proteína 78 activadora de neutrófilos epiteliales (ENA-78), folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), proteína oncogénica regulada por el crecimiento (GRO), interleucina-6 (IL-6), IL-8, leptina, proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), MCP-3, subunidad B de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFB), rantes, factor de crecimiento

transformante beta 1 (TGF- β 1), trombopoyetina (Tpo)), inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP1), TIMP2 y/o receptor de activador del plasminógeno uroquinasa (uPAR).

[00263] Se pueden usar métodos para modificar genéticamente células, por ejemplo, con vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados, polietilenglicol u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen el uso de vectores de expresión que transportan y expresan moléculas de ácido nucleico en las células. (Ver Geoddel; Tecnología de Expresión Génica: Métodos en Enzimología 185, Academic Press, San Diego, California (1990)).

El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras se pueden encontrar en Sambrook. Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989) y otros libros de texto de laboratorio.

[00264] Las células placentarias, por ejemplo, las PDACs descritas en la Sección 5.2 anterior, pueden modificarse genéticamente introduciendo ADN o ARN en la célula, por ejemplo, ADN o ARN que codifica una proteína de interés, mediante métodos que incluyen la transferencia viral, incluido el uso de ADN o vectores víricos de ARN, tales como retrovirus (que incluyen lentivirus), virus de simio 40 (SV40), adenovirus, virus Sindbis y virus del papiloma bovino, por ejemplo; transferencia química, que incluye la transfección con fosfato de calcio y los métodos de transfección de DEAE con dextrano; transferencia de fusión de membrana, usando vesículas de membrana cargadas con ADN tales como liposomas, fantasmas de glóbulos rojos y protoplastos, por ejemplo; o técnicas de transferencia física, como microinyección, electroporación o transferencia de ADN desnudo. Las células placentarias pueden alterarse genéticamente mediante la inserción de ADN exógeno o mediante la sustitución de un segmento del genoma celular con ADN exógeno. La inserción de secuencia (s) de ADN exógeno se puede realizar, por ejemplo, mediante recombinación homóloga o mediante integración viral en el genoma de la célula huésped, o incorporando el ADN en la célula, particularmente en su núcleo, usando un vector de expresión de plásmido y una secuencia de localización nuclear. El ADN puede comprender uno o más

promotores que permiten la inducción positiva o negativa de la expresión de la proteína de interés usando ciertos productos químicos/fármacos, por ejemplo, tetraciclina; los promotores pueden, en otras modalidades, ser constitutivos.

[00265] La transfección con fosfato de calcio puede usarse para introducir, por ejemplo, ADN de plásmido que contiene una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de interés, en una célula. En ciertas modalidades, el ADN se combina con una solución de cloruro de calcio, luego se agrega a una solución tamponada con fosfato. Una vez que se ha formado un precipitado, la solución se agrega directamente a las células cultivadas. El tratamiento con DMSO o glicerol puede usarse para mejorar la eficacia de la transfección, y los niveles de transfectantes estables se pueden mejorar usando bis-hidroxietilamino etanosulfonato (BES). Los sistemas de transfección de fosfato de calcio están disponibles comercialmente (por ejemplo, PROFECTION®, Promega Corp., Madison, WI). La transfección con DEAE-dextrano también se puede usar.

[00266] Las células placentarias aisladas también pueden modificarse genéticamente mediante microinyección. En ciertas modalidades, una micropipeta de vidrio es guiada al núcleo de las células bajo un microscopio óptico para inyectar ADN o ARN.

[00267] Las células de la placenta también se pueden modificar genéticamente mediante electroporación. En ciertas modalidades, se agrega ADN o ARN a una suspensión de células cultivadas, y la suspensión de células de ADN/ARN se coloca entre dos electrodos y se somete a un pulso eléctrico, causando una permeabilidad transitoria en la membrana externa de la célula que se manifiesta por la aparición de los poros a través de la membrana.

[00268] La administración liposómica de ADN o ARN para modificar genéticamente las células se puede realizar usando liposomas catiónicos, que incluyen opcionalmente dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) o dioleoil fosfatidilcolina (DOPC), por ejemplo, LIPOFECTIN® (Life Technologies, Inc.). Otros sistemas de administración disponibles comercialmente incluyen EFFECTENE™ (Qiagen), DOTAP (Roche Molecular Biochemicals), FUGENE 6™. (Roche Molecular Biochemicals), y TRANSFECTAM® (Promega).

[00269] Los vectores virales se pueden usar para alterar genéticamente las células placentarias mediante el suministro de, por ejemplo, genes diana, polinucleótidos, moléculas antisentido o secuencias de ribozimas en las células. Los vectores retrovirales son efectivos para transducir células que se dividen rápidamente, aunque se han desarrollado varios vectores retrovirales para transferir eficazmente ADN en células que no se dividen también. Las líneas celulares de empaquetamiento para vectores retrovirales son conocidas por los expertos en la técnica. En ciertas modalidades, un vector de ADN retrovírico contiene dos LTRs retrovirales de manera que un primer LTR se localiza 5' con el promotor SV40, que está operativamente unido a la secuencia del gen diana clonada en un sitio de multiclonación, seguido de un segundo LTR 3'. Una vez formado, el vector de ADN retrovírico se transfiere a una línea celular de empaquetamiento usando transfección mediada por fosfato de calcio, como se describió previamente. Después de aproximadamente 48 horas de producción del virus, el vector viral, que ahora contiene la secuencia del gen diana, se cosecha. Los métodos para transfectar células usando vectores lentivirales, virus herpes recombinantes, vectores adenovirales o vectores de alfavirus son conocidos en la técnica.

[00270] La transfección o transducción exitosa de células diana se puede demostrar usando marcadores genéticos, en una técnica que se conoce por los expertos en la técnica. La proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria*, por ejemplo, ha demostrado ser un marcador efectivo para identificar y rastrear células hematopoyéticas genéticamente modificadas. Marcadores seleccionables alternativos incluyen el gen beta-Gal, el receptor de factor de crecimiento nervioso truncado o marcadores seleccionables de fármaco (que incluyen, pero sin limitación, NEO, MTX o higromicina).

5.7.3 Composiciones Farmacéuticas

[00271] Poblaciones de células placentarias aisladas estimuladas, por ejemplo, PDACs, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , o poblaciones de células que comprenden las células placentarias estimuladas aisladas, puede formularse en composiciones farmacéuticas para uso in vivo, por ejemplo, en los métodos de tratamiento proporcionados en este documento. Tales composiciones farmacéuticas

comprenden una población de células placentarias aisladas estimuladas, o una población de células que comprende células placentarias aisladasestimuladas, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable aceptada para administración in vivo. Composiciones

- 5 farmacéuticas que comprenden las células placentarias aisladas estimuladas descritas en este documento pueden comprender cualquiera, o cualquier combinación, de las poblaciones de células placentarias aisladasestimuladas, o células placentarias aisladas estimuladas, descritas en otra parte en este documento. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células placentarias aisladas estimuladas fetales, 10 maternas, o ambas fetales y maternas. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente pueden comprender además células placentarias aisladasestimuladas obtenidas a partir de un solo individuo o placenta, o de una pluralidad de individuos o placentas.

- [00272]** Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento 15 pueden comprender cualquier cantidad de células placentarias aisladasestimuladas. Por ejemplo, una sola dosis unitaria de células placentarias aisladas estimuladas puede comprender, en diversas modalidades, aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^2 , 5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más de células placentarias 20 aisladas. En otras modalidades, una sola dosis unitaria de células placentarias aisladas estimuladas puede comprender aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^2 - 5×10^2 , 5×10^2 - 1×10^3 , 1×10^3 - 5×10^3 , 5×10^3 - 1×10^4 , 1×10^4 - 5×10^4 , 5×10^4 - 1×10^5 , 1×10^5 - 5×10^5 , 5×10^5 - 1×10^6 , 1×10^6 - 5×10^6 , 5×10^6 - 1×10^7 , 1×10^7 - 5×10^7 , 5×10^7 - 1×10^8 , 1×10^8 - 5×10^8 , 5×10^8 - 1×10^9 , 1×10^9 - 5×10^9 , 5×10^9 - 1×10^{10} , 1×10^{10} - 5×10^{10} , 5×10^{10} - 1×10^{11} , o 1×10^{11} - 5×10^{11} 25 o más células placentarias aisladas.

- [00273]** Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento comprenden poblaciones de células que comprenden 50% de células viables o más (es decir, al menos 50% de las células en la población son funcionales o están vivas). Preferiblemente, al menos el 60% de las células en la población son viables. Más 30 preferiblemente, al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las células en la población en la composición farmacéutica son viables.

[00274] Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente pueden comprender uno o más compuestos que, por ejemplo, facilitan el injerto (por ejemplo, anticuerpos del receptor de células T, un inmunosupresor o similares); estabilizadores tales como albúmina, dextrano 40, gelatina, almidón de hidroxietilo, plaslitato y similares.

[00275] Cuando se formula como una solución inyectable, en una modalidad, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 1% a 1,5% de HSA y aproximadamente 2,5% de dextrano. En una modalidad preferida, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 5×10^6 células por mililitro a aproximadamente 2×10^7 células por mililitro en una solución que comprende HSA al 5% y dextrano al 10%, que comprende opcionalmente un inmunosupresor, por ejemplo, ciclosporina A a, por ejemplo, 10 mg/kg.

[00276] En otras modalidades, la composición farmacéutica, por ejemplo, una solución, comprende una pluralidad de células, por ejemplo, células placentarias aisladas estimuladas, por ejemplo, PDACs, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , en el que dicha composición farmacéutica comprende entre aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro y aproximadamente $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células por mililitro. En otras modalidades, la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por mililitro y aproximadamente $3,75 \times 10^6$ células por mililitro. En otras modalidades, la composición farmacéutica comprende entre 1×10^6 y 50×10^6 células/ml aproximadamente, entre 1×10^6 y 40×10^6 células/ml aproximadamente, entre 1×10^6 y 30×10^6 células/ml aproximadamente, entre 1×10^6 y 20×10^6 células/ml aproximadamente, entre 1×10^6 y 15×10^6 células/ml aproximadamente o entre 1×10^6 y 10×10^6 células/ml aproximadamente. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica no comprende grumos de células visibles (es decir, no hay grumos de macrocélulas), o sustancialmente no tiene tales grumos visibles. Como se usa en el presente documento, "agrupaciones de macrocélulas" significa una agregación de células visibles sin ampliación, por ejemplo, visible a simple vista, y generalmente se refiere a una agregación celular mayor que aproximadamente 150 micrómetros. En algunas modalidades, 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% o 10% de dextrano, por ejemplo, dextrano-40 . En una modalidad específica, dicha composición comprende aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9% de dextrano-40. En una modalidad específica, dicha composición comprende aproximadamente 5,5% de dextrano-40. En ciertas modalidades, la composición

5 farmacéutica comprende de aproximadamente 1% a aproximadamente 15% de albúmina de suero humano (HSA). En modalidades específicas, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6,5, 7,5, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15 % HSA. En una modalidad específica, dichas células se han criopreservado y descongelado. En otra modalidad específica, dichas células

10 se han filtrado a través de un filtro de 70 μ M a 100 μ M. En otra modalidad específica, dicha composición no comprende grumos de células visibles. En otra modalidad específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 200 agrupaciones de células por 10^6 células, en donde dichas agrupaciones de células son visibles solo bajo un microscopio, por ejemplo, un microscopio óptico. En otra

15 modalidad específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 150 agrupaciones de células por 10^6 células, en donde dichas agrupaciones de células son visibles solo bajo un microscopio, por ejemplo, un microscopio óptico. En otra modalidad específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 100 agrupaciones de células por 10^6 células, en donde dichas agrupaciones de células son

20 visibles solo bajo un microscopio, por ejemplo, un microscopio óptico.

[00277] En una modalidad específica, la composición farmacéutica comprende aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro, aproximadamente 5,5% de dextrano-40 (p/v), aproximadamente 10% de ASH (p/v), y aproximadamente 5% de DMSO (v/v)

25 **[00278]** En otras modalidades, la composición farmacéutica comprende una pluralidad de células estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β en una solución que comprende dextrano-40 al 10%, donde la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro y aproximadamente $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células por mililitro, y en donde

30 dicha composición no comprende grupos celulares visibles a simple vista (es decir, no comprende grupos de macrocélulas). En algunas modalidades, la composición

farmacéutica comprende entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por mililitro y aproximadamente $3,75 \times 10^6$ células por mililitro. En una modalidad específica, dichas células se han crioconservado y descongelado. En otra modalidad específica, dichas células se han filtrado a través de un filtro de $70 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$. En otra modalidad específica, dicha composición comprende menos de aproximadamente 200 agrupaciones de microcélulas (es decir, agrupaciones de células visibles únicamente con aumento) por 10^6 células. En otra modalidad específica, la composición farmacéutica comprende menos de aproximadamente 150 grupos de microcélulas por 10^6 células. En otra modalidad específica, la composición farmacéutica comprende menos de aproximadamente 100 grupos de microcélulas por 10^6 células. En otra modalidad específica, la composición farmacéutica comprende menos del 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, o DMSO al 2%, o menos del 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% o 0,1% de DMSO.

[00279] Se proporcionan adicionalmente en el presente documento composiciones que comprenden células estimuladas, *ej.*, PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β en donde dichas composiciones se producen mediante uno de los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, la composición farmacéutica comprende células, en donde la composición farmacéutica se produce mediante un método que comprende filtrar una solución que comprende células placentarias, por ejemplo, células madre placentarias o células multipotentes placentarias, para formar una solución filtrada que contiene células; diluyendo la solución filtrada que contiene células con una primera solución 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 , o 1 a 10×10^6 células por mililitro, por ejemplo, antes de la crioconservación; y diluyendo la solución filtrada resultante que contiene células con una segunda solución que comprende dextrano, pero que no comprende albúmina de suero humano (HSA) para producir dicha composición. En ciertas modalidades, dicha dilución es a no más de aproximadamente 15×10^6 células por mililitro. En ciertas modalidades, dicha dilución es a no más de aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro. En ciertas modalidades, dicha dilución es a no más de aproximadamente 7.5×10^6 células por mililitro. En otras de éstas modalidades, si la solución que contiene células filtradas, antes de la dilución,

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

[00280] En una modalidad específica, las células estimuladas, *ej.*, PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β se crioconservan entre dicha dilución con una primera solución de dilución y dicha dilución con dicha segunda solución de dilución. En otra modalidad específica, la primera solución de dilución comprende dextrano y HSA. El dextrano en la primera solución de dilución o segunda solución de dilución puede ser dextrano de cualquier peso molecular, por ejemplo, dextrano que tenga un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 150 kDa. En algunas modalidades, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución es aproximadamente 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0 %, 8.5%, 9.0%, 9.5% o 10% de dextrano. En otra modalidad específica, el dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano-40. En otra modalidad específica, el dextrano en dicha primera solución de dilución y dicha segunda solución de dilución es dextrano-40. En otra modalidad específica, dicho dextrano-40 en dicha primera solución de dilución es 5,0% de dextrano-40. En otra modalidad específica, dicho dextrano-40 en dicha primera solución de dilución es 5,5% de dextrano-40. En otra modalidad específica, dicho dextrano-40 en dicha segunda solución de dilución es 10% de dextrano-40. En otra modalidad específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es de 1 a 15 % de HSA. En otra modalidad específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15 % HSA. En otra modalidad específica, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es 10% HSA. En otra modalidad específica, dicha primera solución de dilución comprende HSA. En otra modalidad específica, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es 10% de HSA. En otra modalidad específica, dicha primera solución de dilución comprende un crioprotector.

En otra modalidad específica, dicho crioprotector es DMSO. En otra modalidad específica, dicho dextrano-40 en dicha segunda solución de dilución es aproximadamente 10% de dextrano-40. En otra modalidad específica, dicha composición que comprende células comprende aproximadamente 7,5% a

aproximadamente 9% de dextrano. En otra modalidad específica, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ células por mililitro a aproximadamente $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células por mililitro. En otra modalidad específica, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por mililitro a aproximadamente $3,75 \times 10^6$ células por mililitro.

[00281] En otra modalidad, la composición farmacéutica se prepara mediante un método que comprende (a) filtrar una solución que contiene células que comprende células placentarias estimuladas, ej., PDACs estimuladas, por ejemplo PDACs estimuladas con IL-1 β , antes de la crioconservación para producir una solución filtrada que contiene células; (b) crioconservar las células en la solución filtrada que contiene células aproximadamente a 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 , o 1 a 10×10^6 células por mililitro; (c) descongelar las células; y (d) diluir la solución filtrada que contiene células a 1: 1 a 1:11 (v/v) aproximadamente con una solución de dextrano-40. En ciertas modalidades, si el número de células es menor que aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro antes del paso (a), la filtración es opcional. En otra modalidad específica, las células en la etapa (b) se crioconservan a aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro. En otra modalidad específica, las células en la etapa (b) se crioconservan en una solución que comprende de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% de dextrano-40 y HSA. En ciertas modalidades, dicha dilución en la etapa (b) es no más de aproximadamente 15×10^6 células por mililitro.

[00282] En otra modalidad, la composición farmacéutica se prepara mediante un método que comprende: (a) suspender células placentarias estimuladas, ej., PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β , en una solución de dextrano-40 al 5,5% que comprende HSA al 10% para formar una solución que contiene células; (b) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70 μ M; (c) diluir la solución que contiene células con una solución que comprende dextrano-40 al 5.5%,

HSA al 10% y DMSO al 5% de 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 , o 1 a 10×10^6 células por mililitro; (d) crioconservar las células; (e) descongelar las células; y (f) diluir la solución que contiene células de 1: 1 a 1:11 (v/v) con dextrano-40 al 10%. En ciertas modalidades, dicha dilución en la etapa (c) es no más de aproximadamente 15×10^6 células por mililitro. En ciertas modalidades, dicha dilución en la etapa (c) es a no más de aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células/ml. En ciertas modalidades, dicha dilución en la etapa (c) es no más de aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células/ml.

[00283] En otra modalidad, la composición que comprende células estimuladas se prepara mediante un método que comprende: (a) centrifugar una pluralidad de celdas para recoger las celdas; (b) resuspender las células en dextrano-40 al 5,5%; (c) centrifugar las células para recoger las células; (d) resuspender las células en una solución de dextrano-40 al 5,5% que comprende 10% de HSA; (e) filtrar las células a través de un filtro de 70 μ M; (f) diluir las células en 5.5% de dextrano-40, 10% HSA y 5% DMSO 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 , o 1 a 10×10^6 células por mililitro; (g) crioconservar las células; (h) descongelar las células; y (i) diluir las células de 1: 1 a 1:11 (v/v) con 10% de dextrano-40. En ciertas modalidades, dicha dilución en la etapa (f) es no más de aproximadamente 15×10^6 células por mililitro. En ciertas modalidades, dicha dilución en la etapa (f) es de no más de $10 \pm 3 \times 10^6$ células/ml aproximadamente. En ciertas modalidades, dicha dilución en la etapa (f) no es superior a 7.5×10^6 células/ml aproximadamente. En otras ciertas modalidades, si el número de células es menor que aproximadamente $10 \pm 3 \times 10^6$ células por mililitro, la filtración es opcional.

[00284] Las composiciones, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden las células placentarias aisladas estimuladas descritas en este documento, pueden comprender cualquiera de las células placentarias aisladas descritas en este documento.

[00285] Se pueden usar otras formulaciones inyectables, adecuadas para la administración de productos celulares.

[00286] En una modalidad, la composición farmacéutica comprende células placentarias aisladas estimuladas que son sustancialmente, o completamente de origen

no materno, es decir, tienen el genotipo fetal; por ejemplo, al menos 90%, 95%, 98%, 99% o 100% aproximadamente son de origen no materno. Por ejemplo, en una modalidad, una composición farmacéutica comprende una población de células placentarias aisladas estimuladas que son CD200⁺ y LA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺, y D200⁺;

5 CD200⁺ y OCT4-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ y LA-G⁻; CD73⁺ y D105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende dicha población de células placentarias aisladas cuando dicha población de células placentarias se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embrioide; u OCT-4⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos tipo

10 embrioide en una población de células placentarias que comprende dicha población de células placentarias aisladas cuando dicha población de células placentarias se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embrioide ; o una combinación de los anteriores, en donde al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de dichas células placentarias aisladas son de origen no materno. En otra modalidad, una

15 composición farmacéutica comprende una población de células placentarias aisladas que son CD10⁺, CD105⁺ y CD34⁻; CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ y CD34⁻; CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ y al menos uno de CD90⁺ o CD45⁻; CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ y CD45⁻; CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ y CD45⁻; CD200⁺ y HLA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺, y CD200⁺; CD200⁺ y OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻; CD73⁺ y

20 CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende dichas células placentarias aisladas cuando dicha población de células placentarias se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embrioide.; OCT-4⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que

25 comprende dichas células placentarias aisladas cuando dicha población de células placentarias se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embrioide; o uno o más de CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻, CD80⁻, CD86⁻, HLA-A,B,C⁺, HLA-DP, DQ, DR⁻, y/o PDL1⁺; o una combinación de los anteriores, en donde al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de dichas células placentarias aisladas son de origen no

30 materno. En una modalidad específica, la composición farmacéutica comprende adicionalmente una célula madre que no se obtiene de una placenta. En otra

modalidad, las células madre placentarias aisladas se estimulan con una o más citoquinas proinflamatorias. En modalidades específicas, las citocinas proinflamatorias comprenden uno o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α e INF- γ . En otras modalidades específicas, la citoquina proinflamatoria es IL-1 β .

- 5 **[00287]** Las células placentarias aisladas en las composiciones, ej., las composiciones farmacéuticas, proporcionadas en este documento, pueden comprender células placentarias derivadas de un único donante, o de múltiples donantes. Las células placentarias aisladas pueden ser completamente compatibles con HLA para un receptor pretendido, o pueden no coincidir con HLA parcial o completamente.

10 **5.7.4 Matrices que Comprenden Células Placentarias Aisladas**

[00288] También se proporcionan aquí composiciones que comprenden matrices, hidrogeles, armazones, y similares que comprenden una célula placentaria, o una población de células placentarias aisladas. Tales composiciones se pueden usar en lugar de, o además de, las células en suspensión líquida.

- 15 **[00289]** Las células placentarias aisladas estimuladas descritas en este documento se pueden sembrar en una matriz natural, por ejemplo, un biomaterial placentario tal como un material de membrana amniótica. Tal material de membrana amniótica puede ser, por ejemplo, membrana amniótica disecada directamente de una placenta de mamífero; membrana amniótica fija o tratada térmicamente, membrana amniótica sustancialmente seca (es decir, <20% de H₂O), membrana coriónica, membrana coriónica sustancialmente seca, membrana amniótica y coriónica sustancialmente seca, y similares. Biomateriales placentarios preferidos en los que se pueden sembrar células placentarias aisladas se describen en Hariri, publicación de solicitud de los Estados Unidos N° 2004/0048796, cuya descripción se incorpora aquí
- 20
- 25 como referencia en su totalidad.

- [00290]** Las células placentarias aisladas estimuladas descritas en este documento pueden suspenderse en una solución de hidrogel adecuada para, por ejemplo, inyección. Hidrogeles adecuados para tales composiciones incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD16. En una modalidad, se puede permitir que una solución de hidrogel que comprende las células se endurezca, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tenga células dispersas en su interior para su
- 30

implantación. Las células placentarias aisladas en dicha matriz también se pueden cultivar de modo que las células se expandan mitóticamente antes de la implantación.

El hidrogel es, por ejemplo, un polímero orgánico (natural o sintético) que está reticulado a través de enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura reticular tridimensional abierta que atrapa las moléculas de agua para formar un gel. Los materiales formadores de hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sus sales, péptidos, polifosfazinas y poliacrilatos, que están reticulados iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de bloques de poli (óxido de etileno) -propilenoglicol que están reticulados por temperatura o pH, respectivamente. En algunas modalidades, el hidrogel o matriz es biodegradable.

[00291] En algunas modalidades, la formulación comprende un gel polimerizable in situ (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2002/0022676, cuya descripción se incorpora aquí como referencia en su totalidad; Anseth y col., J. Control Release 2002, 78). (1-3): 199-209; Wang y col., Biomaterials 24 (22):3969-80(2003).

[00292] En algunas modalidades, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas, o soluciones acuosas de alcohol, que tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que pueden reaccionar con cationes son poli (fosfacenos), poli (ácidos acrílicos), poli (ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli (acetato de vinilo) y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. También se pueden usar copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de éter vinílico. Ejemplos de grupos ácidos son grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos de alcohol halogenados (preferiblemente fluorados), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.

[00293] En una modalidad específica, la matriz es un fieltro, que puede estar compuesto por un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL o ácido hialurónico. El hilo se transforma en un fieltro utilizando técnicas estándar de procesamiento de textiles que consisten en rizado, corte, cardado y punzonado. En otra modalidad preferida, las células de la

invención se siembran sobre armazones de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Además, el marco tridimensional se puede moldear en una forma útil, como una estructura específica en el cuerpo que se reparará, reemplazará o aumentará. Otros ejemplos de armazones que se pueden usar incluyen esterillas no tejidas, espumas porosas o péptidos autoensamblables. Las esteras no tejidas se pueden formar usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (por ejemplo, PGA/PLA) (VICRYL®, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli (ε-caprolactona)/poli (ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos tales como liofilización o liofilización (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6,355,699), también se pueden utilizar como andamios.

[00294] Las células placentarias aisladas estimuladas descritas en la presente memoria o los cocultivos de las mismas se pueden sembrar en un armazón o andamio tridimensional e implantar in vivo. Dicho marco puede implantarse en combinación con uno o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que, por ejemplo, estimulan la formación de tejido.

[00295] Ejemplos de armazones que se pueden usar incluyen esterillas no tejidas, espumas porosas o péptidos autoensamblables. Las esteras no tejidas se pueden formar usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (por ejemplo, PGA/PLA) (VICRYL®, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli (ε-caprolactona)/poli (ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos tales como liofilización o liofilización (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6,355,699), también se pueden utilizar como andamios.

[00296] En otra modalidad, las células placentarias aisladas estimuladas pueden sembrarse sobre, o ponerse en contacto con, un fieltro, que puede estar, por ejemplo, compuesto por un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible tal como copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL o ácido hialurónico.

[00297] Las células placentarias aisladas estimuladas proporcionadas aquí pueden, en otra modalidad, ser sembradas en armazones de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Tales andamios de espuma se pueden moldear en una forma

útil, tal como la de una parte de una estructura específica en el cuerpo que se va a reparar, reemplazar o aumentar. En algunas modalidades, el marco se trata, por ejemplo, con ácido acético 0.1 M seguido de incubación en polilisina, PBS, y/o colágeno, antes de la inoculación de las células con el fin de mejorar la unión celular.

- 5 Las superficies externas de una matriz pueden modificarse para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, como el recubrimiento con plasma de la matriz o la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, sulfato de condroitina-4, sulfato de condroitina-6, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, etc.), una matriz celular y/u otros materiales tales como, entre
10 otros, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales, y similares.

- [00298]** En algunas modalidades, el andamio comprende, o se trata con, materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y sostener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de
15 la matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de membrana basal tales como laminina y colágeno Tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE y siliconas de poliuretano urea segmentadas, tales como PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). El armazón también puede comprender agentes
20 antitrombóticos tales como heparina; los andamios también se pueden tratar para alterar la carga superficial (por ejemplo, recubrimiento con plasma) antes de sembrar con células placentarias aisladas estimuladas.

- [00299]** Las células placentarias estimuladas (por ejemplo, PDACs estimuladas, por ejemplo, PDACs estimuladas con IL-1 β) proporcionadas en la presente también
25 pueden sembrarse sobre, o ponerse en contacto con un material cerámico fisiológicamente aceptable que incluye, pero no se limita a, mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri- y tetra-fosfato de cálcico, hidroxiapatita, fluoroapatitas, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de calcio y magnesio, cristales biológicamente activos como BIOGLASS® y mezclas de los
30 mismos. Los materiales cerámicos biocompatibles porosos actualmente comercialmente disponibles incluyen SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canadá),

ENDO BON[®] (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS[®] (Mathys, AG, Bettlach, Suiza) y productos de injerto de hueso de colágeno mineralizado como HEALOS[™] (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITOSS[®], RHAKOSS[™] y CORTOSS[®] (Orthovita, Malvern, PA). El marco puede ser una mezcla, mezcla o compuesto de materiales naturales y/o sintéticos.

[00300] En una modalidad, las células placentarias aisladas estimuladas se siembran sobre, o se ponen en contacto con, un andamio adecuado de entre 0.5×10^6 y 8×10^6 células/ml aproximadamente.

5.8 Kits

[00301] En otro aspecto, se proporcionan en la presente kits, adecuados para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, que comprende, en un recipiente separado del contenido restante del kit, PDACs estimuladas, por ejemplo, las células descritas en la Sección 5.2, arriba (ej., PDACs estimuladas con IL-1 β) e instrucciones de uso. Preferiblemente, las células placentarias estimuladas se proporcionan en una solución farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución adecuada para administración intralesional o una solución adecuada para administración intravenosa. En ciertas modalidades, las células madre placentarias estimuladas o células multipotentes placentarias estimuladas son cualquiera de las células placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ descritas en la presente, por ejemplo, células placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ o células placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺

[00302] En ciertas modalidades, los kits comprenden uno o más componentes que facilitan la administración de las células placentarias estimuladas al individuo. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el kit comprende componentes que facilitan la administración intralesional de las células placentarias estimuladas al individuo. En dichas modalidades, el kit puede comprender, por ejemplo, jeringas y agujas adecuadas para el suministro de células al individuo, y similares. En tales modalidades, las células placentarias estimuladas pueden estar contenidas en el kit en una bolsa, o en uno o más viales. En ciertas otras modalidades, el kit comprende componentes que facilitan la administración intravenosa o intraarterial de las células

placentarias estimuladas al individuo. En tales modalidades, las células placentarias estimuladas pueden estar contenidas, por ejemplo, dentro de una botella o bolsa (por ejemplo, una bolsa de sangre o una bolsa similar capaz de contener hasta aproximadamente 1,5 l de solución que comprende las células), y el kit comprende

5 adicionalmente tubos y agujas adecuadas para la entrega de células al individuo.

[00303] Adicionalmente, el kit puede comprender uno o más compuestos que reducen el dolor o la inflamación en el individuo (por ejemplo, un compuesto antiinflamatorio analgésico, esteroideo o no esteroideo o similares. El kit también puede comprender un compuesto antibacteriano o antiviral (por ejemplo, uno o más

10 antibióticos), un compuesto para reducir la ansiedad en el individuo (por ejemplo, alaprazolam), un compuesto que reduce la respuesta inmune en el individuo (por ejemplo, ciclosporina A), un antihistamínico (difenhidramina, loratadina, desloratadina, quetiapina, fexofenadina, cetirizina, prometazina, clorefeniramina, levocetirizina, cimetidina, famotidina, ranitidina, nizatidina, roxatidina, lafutidina o similares).

15 **[00304]** Adicionalmente, el kit puede comprender artículos desechables, por ejemplo, toallitas estériles, artículos de papel desechables, guantes o similares, que facilitan la preparación del individuo para la administración o que reducen la probabilidad de infección en el individuo como resultado de la administración de las células placentarias estimuladas.

20 6. EJEMPLOS

6.1 EJEMPLO 1: EL EFECTO DE LOS FACTORES PDAC SECRETADOS SOBRE LA SUPERVIVENCIA, PROLIFERACIÓN Y MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS VASCULARES

6.1.1 Factor de crecimiento PDAC y Secreción de Citoquinas

25 **[00305]** Se descongelaron alícuotas congeladas de células madre adherentes derivadas de placenta (PDACs) y se expandieron en medio de crecimiento completo (Medio de Eagle modificado de Dulbecco [DMEM] suplementado con suero de ternera fetal al 10%). A continuación, se incubaron las PDACs cultivadas en DMEM libre de suero durante 24 horas y se recogieron las muestras de medios acondicionadas con

30 células PDAC (P-CM). Las concentraciones de factores tróficos secretados en P-CM

se determinaron usando dos paneles de inmunoanálisis Milliplex® MAP (Panel 1 de angiogénesis humana/factor de crecimiento y Panel de citocina/quimiocina humana) (Millipore). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 1. Se determinó que P-CM contiene niveles detectables de diversos factores angiogénicos tróficos, incluidos IL-8, MCP-1, VEGF-a, folistatina, GRO, HGF e IL-6, lo que indica que las PDAC cultivadas son capaces de secretar factores angiogénicos.

6.1.2 Los Factores Secretados de PDAC Alteran la sSupervivencia de HUVEC y la Formación de Tubos

[00306] Las células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) se descongelaron y plaquearon en placas revestidas con fibronectina en medio de crecimiento endotelial completo (EGMTM-2) (Lonza) durante la noche. Las HUVEC se cultivaron en medio basal endotelial libre de suero (EBMTM-2) (Lonza) durante 6 horas, seguido de incubación en muestras de medio acondicionadas con células PDAC (P-CM) durante 16 horas a una concentración de P-CM de 0,104 ml/cm² del matraz de cultivo. La viabilidad de las células HUVEC tratadas se determinó mediante tinción Hoechst (Invitrogen) seguido de análisis de imágenes cuantitativas usando el Analizador InCell 2000 (GE Healthcare). Como se muestra en la Figura 2A, en comparación con las HUVECs tratadas con DMEM solo, las HUVEC incubadas con P-CM tuvieron una tasa de proliferación/supervivencia significativamente mayor.

[00307] En un experimento separado, las HUVECs fueron privadas de suero en EBMTM-2 durante 3 horas y se cosecharon. Las HUVEC se volvieron a sembrar en placas Cultrex (Trevigen) con factor de crecimiento con recubrimiento previo, ya sea en presencia de P-CM o DMEM solo. Las HUVECs sembradas nuevamente se analizaron luego en un IncuCyte ZOOM (Essen Bioscience) durante 16 horas para determinar el grado de formación de tubos HUVEC. Las imágenes se analizaron utilizando ImageJ utilizando el kit de herramientas del analizador de angiogénesis. Las HUVEC tratadas con P-CM formaron redes significativamente más largas (Figura 2B) y significativamente más tubos que las HUVECs de control (Figura 2C). Estos datos indican que P-CM promueve la formación de tubos y la ramificación en modelos de angiogénesis de células vasculares.

6.2 EJEMPLO 2: LOS FACTORES PDAC SECRETADOS AFECTAN A LA SEÑALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE CÉLULAS HUVEC

6.2.1 El medio condicionado PDAC altera las vías de señalización HUVEC

5 **[00308]** Las HUVECs fueron descongeladas y cultivadas durante dos días como se describe en la Sección 6.1, anterior. Las HUVEC fueron entonces privadas de suero durante 6 horas en EBMTM-2 libre de suero, seguido de cultivo en presencia o ausencia de P-CM durante 5, 15 o 30 minutos. Los efectos de P-CM en la señalización de células HUVEC se evaluaron usando Análisis Milliplex de Señalización de Células
10 Multi-Vía MAP Milliplex® (EMD Millipore).

[00309] Como se muestra en la Figura 3, las HUVEC tratadas con P-CM (carriles "Tx") mostraron niveles dramáticamente más altos de MEK fosforilada, ERK1/2 fosforilada, Akt fosforilada y niveles de STAT3 fosforilados en todos los puntos de tiempo analizados en comparación con los controles del medio de cultivo (carriles de
15 "Medio de Control"). Estos resultados indican que las células vasculares tratadas con medio acondicionado con PDACs pueden promover diferentes vías de señalización celular conocidas que se sabe están implicadas en la proliferación celular (MEK1, ERK1/2), supervivencia (Akt) y ramificación (STAT3).

6.2.2 El medio condicionado PDAC altera la expresión génica de HUVEC

20 **[00310]** Las HUVEC se cultivaron y se privaron de suero como en la Sección 6.2.1, Anterior. Las HUVECs luego se cultivaron en presencia de P-CM durante 4, 24 o 48 horas, y se recogieron para el análisis. La expresión del gen VEGF se midió utilizando matrices de rutas VEGF humanas Taqman y el sistema QuantStudio 12K PCR en tiempo real (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante.
25 Como se muestra en la Figura 4, el cultivo de HUVECs en P-CM dio como resultado la inducción de numerosos genes durante el transcurso de 48 horas. Los genes implicados en la transducción, proliferación y supervivencia de señales (fila superior); motilidad, estructura e integridad celular (fila central); y la síntesis y angiogénesis de óxido nítrico (fila inferior) se incrementaron todas en HUVECs ("P-CM") tratadas con P-

CM en relación con los controles tratados con medio ("SF EBM-2"). Los genes que se muestran en la Figura 4 se enumeran a continuación en la Tabla 1 según su función.

Tabla 1: Genes HUVEC Aumentados por Medio de Cultivo Acondicionado con PDAC

Transducción, Proliferación y Supervivencia de Señales	Motilidad, Estructura e Integridad	Angiogénesis	Síntesis de Óxido Nítrico
KRAS	ACTA2	VEGFA	NOS3
MAP2K4	ACTG1		
MAP2K6	ACTB		
PIK3R1	HSPB1		
PIK3CA	PXN		

6.3 EJEMPLO 3: EFECTOS DE IL-1 BETA SOBRE FACTORES TRÓFICOS PDAC SECRETADOS

[00311] Las PDACs se cultivaron en medio de crecimiento durante 24 horas. Se añadió IL-1 β al medio de crecimiento a concentraciones que varían de 10 pg/ml a 10.000 pg/ml, y se midieron los factores PDAC secretados usando dos paneles de inmunoanálisis Milliplex® MAP (Panel 1 de factor de angiogénesis/crecimiento humano y panel de citocinas/quimiocinas humanas). (Millipore).

[00312] Como se muestra en la Figura 5, las PDACs estimuladas con IL-1 β produjeron varios factores tróficos de una manera dependiente de la dosis. Estos factores incluyen GM-CSF, G-CSF, IL-6, GRO, MCP-1, Folistatina e IL-8. Por el contrario, la producción de muchos otros factores tróficos no cambió después de la estimulación de PDACs con IL-1 β , lo que indica que IL-1 β promueve la secreción de un subconjunto específico de factores tróficos en PDACs cultivadas.

6.4 EJEMPLO 4: EL MEDIO ACONDICIONADO CON PDACS IL-1BETA ESTIMULADAS ALTERA LA SEÑALIZACIÓN DE CÉLULAS HUVEC

[00313] Como se muestra en la Figura 6, las HUVECS cultivadas en presencia de P-CM estimulada por IL-1 β exhibieron mayores niveles de señalización en comparación con las células cultivadas en presencia de DMEM solo o P-CM no estimulado. Es importante destacar que, P-CM adicionado con IL-1 β también dio como resultado una señalización más baja que la P-CM estimulada por IL-1 β , lo que sugiere que los efectos del P-CM estimulado en HUVECs no son directamente a través de IL-1 β . Se observaron tendencias similares para las vías de señalización celular implicadas en la proliferación (MEK1, ERK1/2) y la morfología de ramificación (STAT3). En conjunto, estos datos sugieren que la estimulación de las PDACs con citoquinas proinflamatorias puede promover las vías de señalización proliferativa y morfológica en las células endoteliales.

6.5 EJEMPLO 5: LA SEÑAL DE LOS EFECTOS ESTIMULADOS POR BETA IL-1 A TRAVÉS DE LA VÍA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO HEPÁTICO.

[00314] Las PDACs secretan numerosos factores solubles que pueden contribuir a los efectos proliferativos observados para P-CM. Uno de estos factores, el Factor de Crecimiento Hepático (HGF), es secretado constitutivamente por las PDACs. Además, las HUVECs expresan el receptor de HGF (HGFR, también conocido como c-Met). Para determinar la función de la vía de señalización de HGF en los efectos proangiogénicos de P-CM, se incubó P-CM estimulado por IL-1 β con 500 ng/ml de anticuerpo neutralizante anti-HGF durante 40 minutos (Abcam) antes de añadirlo a las HUVECs privadas de suero. Del mismo modo, las HUVECs se incubaron con PHA665752 20nM, un inhibidor de HGFR/c-Met, durante el paso de inanición de suero de seis horas como se describe en la Sección 6.2.1, Anterior.

[00315] Como se muestra en la Figura 7, el bloqueo de la señalización de HGF con anticuerpo neutralizante anti-HGF o PHA66572 invirtió completamente el aumento inducido por P-CM en las vías de señalización MEK, ERK1/2 y STAT3 (Figuras 7A-C) y parcialmente revirtió este efecto en la vía de señalización de Akt (Figura 7D). Estos datos indican que la inducción mediada por P-CM de las vías proliferativas y

angiogénicas en HUVECs cultivadas está mediada al menos parcialmente a través de la vía de señalización del Factor de Crecimiento Hepático.

6.6 EJEMPLO 6: PROTOCOLO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ÚLCERA DEL PIE DIABÉTICO

- 5 **[00316]** Los sujetos que tienen úlcera del pie diabético (DFU) con enfermedad arterial periférica (PAD), con edades comprendidas entre 18 y 80 años, se tratan con células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ que se han estimulado con IL-1 β . Las células madre placentarias estimuladas con IL-1 β se administran por vía intramuscular en los días 1 (el primer día de tratamiento) y 8 en las siguientes dosis:
- 10 (i): 3x10⁶ células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1 β ; (ii): 1x10⁷ células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, estimuladas con IL-1 β ; o (iii) 3x10⁷ células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1 β .

Criterios de Valoración Clínica

- 15 **[00317]** Un criterio de valoración clínico principal para la eficacia de las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1 β para el tratamiento de DFU puede ser el cierre de la DFU o DFUs que se están tratando. El cierre de la úlcera se puede representar mediante el cierre de la piel sin drenaje o necesidad de apósito. El cierre completo se puede representar mediante la retención
- 20 del cierre de la úlcera durante al menos cuatro semanas después de la determinación del cierre. El cierre de la úlcera se puede evaluar a los tres meses después del tratamiento con las células madre placentarias.

- [00318]** Se pueden incluir otros criterios de evaluación clínica para la eficacia de las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1 β
- 25 para el tratamiento de DFU: (i) reducción de la frecuencia y gravedad de los eventos adversos, que pueden evaluarse hasta 24 meses después del tratamiento; (ii) tiempo para el cierre de la úlcera, que puede evaluarse a los seis meses después del tratamiento; (ii) mejora en el índice braquial de tobillo (ABI), que puede evaluarse a los seis meses después del tratamiento; (iii) mejora en el índice braquial del dedo del pie
- 30 (TBI), que puede evaluarse a los seis meses después del tratamiento; (iv) reducción en el tamaño y número de DFUs, que se puede evaluar hasta 24 meses después del

tratamiento; (v) mejora en el nivel de oxígeno transcutáneo, que puede evaluarse a los seis meses después del tratamiento; (vi) mejora en el registro del volumen del pulso, que puede evaluarse a los seis meses después del tratamiento; (vii) tiempo hasta la amputación mayor, que puede evaluarse hasta 24 meses después del tratamiento; (viii) mejora en la Escala de Clasificación de Wagner, que puede evaluarse hasta 24 meses después del tratamiento; (ix) mejora en los criterios de Rutherford, que se puede evaluar a los seis meses después del tratamiento; y (x) mejora en el puntaje de dolor en reposo de la pierna, que puede evaluarse hasta 24 meses después del tratamiento; y (xi) mejora en la calidad de vida del sujeto evaluada por (i) una Encuesta de Salud de Forma Corta (SF-36) de 36 ítems (ver, por ejemplo, Ware, Medical Care 30 (6): 473-483); (ii) la Forma abreviada de la Escala de Úlcera del Pie Diabético (DFS-SF) (véase, por ejemplo, Bann et al., Pharmacoeconomics, 2003, 21 (17): 1277-90); (iii) Impresión Global del Paciente de Escala de Cambio (véase, por ejemplo, Kamper y col., J. Man. Manip. Ther., 2009, 17 (3): 163-170); y/o (iv) la Escala EuroQol5D (EQ-5D[™]).

Selección de Sujetos

[00319] Los siguientes criterios de elegibilidad se pueden usar para seleccionar sujetos para quienes el tratamiento con células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1 β se considera apropiado. Se tienen en cuenta todas las condiciones médicas y no médicas relevantes al decidir si este protocolo de tratamiento es adecuado para un tema en particular.

[00320] Los sujetos deben cumplir con las siguientes condiciones para ser elegibles para el protocolo de tratamiento:

- Hombres y mujeres, de al menos 18 años de edad o más.
- Entender y firmar voluntariamente un documento de consentimiento informado antes de llevar a cabo evaluaciones/procedimientos relacionados con el estudio.
- Capaz de cumplir con el cronograma de visitas de estudio y otros requisitos de protocolo.
- Diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2.

- 5

 - Úlcera del pie diabético con gravedad de Grado 1 (grosor completo solamente) o Grado 2 en la escala de clasificación de Wagner de más de un mes de duración que no ha respondido adecuadamente a la terapia de úlceras convencionales con un tamaño de al menos 1 cm², excepto si está presente en el dedo del pie. El rango máximo de tamaño de la lesión de la úlcera es ≤ 6.25 cm². La medición de la lesión de la úlcera debe evaluarse y medirse después del desbridamiento (si es necesario) en la consulta de selección.
- 10

 - Sujetos que cumplen uno o más de los siguientes criterios de insuficiencia arterial en el pie con la lesión de la úlcera:
 - a. Enfermedad arterial periférica con ABI ≥ 0.4 y ≤ 0.8 o TBI ≥ 0.30 y ≤ 0.65 .
 - b. Medida de oxígeno transcutáneo (TcPO₂) entre 20-40 mmHg. El área medida con TcPO₂ debe estar libre de edema y engrosamiento de la piel.
- 15

 - No hay revascularización o amputación planificada en los próximos 3 meses después de la visita de selección.
- 20

 - La selección no debe comenzar hasta al menos 14 días después de una intervención de reperfusión fallida y al menos 30 días después de una intervención de reperfusión exitosa.
- 25

 - Los sujetos deben recibir terapia médica apropiada para la hipertensión y diabetes y cualquier otra condición médica crónica para la cual requieren atención continua.
 - Una mujer en edad fértil (FCBP, por sus siglas en inglés) debe tener una prueba de embarazo en suero negativa en el momento de la selección y una prueba de embarazo en orina negativa antes del tratamiento con la terapia de estudio. Además, la FCBP sexualmente activa debe aceptar el uso simultáneo de 2 de las siguientes formas adecuadas de métodos anticonceptivos, tales como: anticoncepción hormonal oral, inyectable o

implantable; ligadura de trompas; DIU; barrera anticonceptiva con espermicida o compañero vasectomizado durante la duración del estudio y el período de seguimiento.

- 5
- Los varones (incluidos los que se han sometido a una vasectomía) deben aceptar usar anticonceptivos de barrera (condones de látex) cuando utilicen anticonceptivos (condones de látex) en la actividad sexual reproductiva con FCBP durante la duración del estudio y el período de seguimiento.

10 **[00321]** Los sujetos que tienen una o más de las siguientes condiciones se pueden excluir del protocolo de tratamiento:

- 15
- Cualquier condición médica significativa, anormalidad de laboratorio o enfermedad psiquiátrica que impida que el sujeto participe en el estudio.
 - Cualquier condición, incluida la presencia de anomalías de laboratorio, que coloca al sujeto en riesgo inaceptable si él o ella participaran en el estudio.
 - Cualquier condición que confunde la capacidad de interpretar datos del estudio.
 - Se sabe que es positivo para el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis C o la infección activa del virus de la hepatitis B.

20

 - Mujeres embarazadas o lactantes.
 - Sujetos con un índice de masa corporal > 40 en el momento de la selección.
 - AST (SGOT) o ALT (SGPT) > 2.5 x el límite superior de la normalidad (ULN) en el momento de la selección.

25

 - Tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) < 30 ml/min/1,73 m² en el momento de la selección calculada usando la ecuación de Modificación de Dieta en Estudio de Enfermedad Renal (Levey, 2006) o la historia de disminución del eGFR > 15 ml/min/1,73 m² en el último año.

- Fosfatasa alcalina > 2.5 x el ULN en el momento de la selección.
- Nivel de bilirrubina > 2 mg/dL (a menos que el sujeto tenga la enfermedad de Gilbert conocida) en el momento de la selección.
- 5 • Infección crónica no tratada o el tratamiento de cualquier infección con antibióticos sistémicos, incluido el sitio de la úlcera, deben estar libres de antibióticos 1 semana antes de la administración de IP.
- Osteomielitis activa, infección o celulitis en o adyacente a la lesión de la úlcera.
- 10 • La lesión de la úlcera que ha disminuido o aumentado de tamaño $\geq 30\%$ durante el período de Selección/Ejecución.
- Dolor en reposo debido a la isquemia de las extremidades.
- Mediciones transcutáneas de oxígeno ≤ 20 mmHg en el pie con la lesión de la úlcera.
- Úlceras en el talón
- 15 • Hipertensión no controlada (definida como presión arterial diastólica > 100 mmHg o presión arterial sistólica > 180 mmHg durante la selección en 2 mediciones independientes tomadas mientras el sujeto está sentado y en reposo durante al menos 5 minutos).
- Diabetes mellitus mal controlada (hemoglobina A1c > 12% o una prueba de glucosa en suero de ≥ 300 mg/dl).
- 20 • Retinopatía proliferativa no tratada.
- Antecedentes de arritmia ventricular maligna, angina de pecho CCS clase III-IV, infarto de miocardio/intervención coronaria percutánea (PCI)/injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG) en los 6 meses previos a la firma del formulario de consentimiento informado (ICF), revascularización coronaria pendiente en los siguientes 3 meses, ataque isquémico
- 25 transitorio/accidente cerebrovascular en los 6 meses previos, antes de

firmar la ICF y/o insuficiencia cardíaca congestiva de etapa III o IV de la Asociación Cardíaca de Nueva York [NYHA].

- ECG anormal: nuevo bloqueo de rama derecha (BBB) $\geq$ 120 ms en los 3 meses anteriores a la firma del ICF.
- 5 • Hipercoagulación no controlada.
- Esperanza de vida inferior a 2 años en el momento de la firma de la ICF debido a enfermedades concomitantes.
- En opinión del investigador, el sujeto no es apto para la terapia celular.
- 10 • Antecedentes de malignidad dentro de los 5 años anteriores a la firma de la ICF, excepto el carcinoma de células basales o de células escamosas de la piel o el historial remoto de cáncer que ahora se considera curado frotis de Papanicolaou curado o prueba de Papanicolaou positiva con posterior seguimiento negativo.
- 15 • Historial de hipersensibilidad a cualquiera de los componentes de la formulación del producto (incluidos productos bovinos o porcinos, dextran 40 y dimetilsulfóxido [DMSO]).
- 20 • El sujeto ha recibido un agente en investigación -un agente o dispositivo no aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) para uso comercializado en cualquier indicación- dentro de los 90 días (o 5 vidas medias, el que sea mayor) antes del tratamiento con terapia de estudio o la participación planificada en otro estudio terapéutico antes de la finalización de este estudio.
- El sujeto ha recibido un gen de investigación o terapia celular previa.

25

Resultado clínico

[00322] La eficacia de las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1β en el tratamiento de DFU se confirma si se demuestra mejoría en uno o más puntos finales clínicos.

6.7 EJEMPLO 7: PROTOCOLO DE TRATAMIENTO ALTERNATIVO DE DFU

[00323] Sujetos que tienen úlcera de pie diabético (DFU) con enfermedad arterial periférica (PAD), de al menos 18 años de edad, son tratados con células madre placentarias estimuladas con IL-1β CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺. Grupo de Sujetos I: 3x10⁶ células madre placentarias estimuladas con IL-1β CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ se administran por vía intramuscular los días 1 (el primer día del tratamiento), 29 y 57. Grupo de Sujetos II: 3x10⁷ células madre placentarias estimuladas con IL-1β CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ se administran por vía intramuscular los días 1 (el primer día del tratamiento), 29 y 57. Grupo de sujetos III: el placebo se administra por vía intramuscular los días 1 (el primer día de tratamiento), 29 y 57.

Criterios de Valoración Clínica

[00324] Un criterio de valoración clínica principal para la eficacia de células madre placentarias estimuladas con IL-1β CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ para tratar la DFU puede ser una mejora en la función vascular de extremidades evaluada mediante la medición del índice braquial del tobillo (ABI); oximetría transcutánea (TCOM), espectroscopía infrarroja cercana, tomografía por emisión de positrones con fludesoxiglucosa/tomografía computarizada (FGD PET/CT), ecografía Doppler, resonancia magnética (RM), angiografía y/o oximetría. La mejora en la función vascular de extremidades puede evaluarse aproximadamente un año después del tratamiento.

[00325] Se pueden incluir otros criterios de evaluación clínica para la eficacia de las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1β para el tratamiento de DFU: (i) cierre de la úlcera y cierre completo de la lesión de la úlcera (el cierre de la úlcera puede representarse por cierre de la piel sin drenaje o necesidad de apósito, el cierre completo puede estar representado por la retención del cierre de la úlcera durante al menos cuatro semanas después de la determinación del cierre) que se puede evaluar aproximadamente un año después del tratamiento; (ii)

reducción de la frecuencia y gravedad de los eventos adversos, que pueden evaluarse aproximadamente un año después del tratamiento; (iii) reducción en el número, tamaño de todas las úlceras y 50% de cierre de la lesión de la úlcera, que puede evaluarse aproximadamente un año después del tratamiento; (iv) una reducción en el tiempo hasta la amputación mayor de la pierna tratada, que puede evaluarse aproximadamente un año después del tratamiento; (v) mejora en la Escala de Calificación de Wagner, que puede evaluarse aproximadamente un año después del tratamiento; (vi) mejora en los criterios de Rutherford, que se puede evaluar aproximadamente un año después del tratamiento; (vii) mejora en el puntaje de dolor en reposo de la pierna, que puede evaluarse aproximadamente un año después del tratamiento; y (viii) mejora en la calidad de vida del sujeto evaluada mediante la impresión global del paciente en cuanto a cambio en neuropatía (PGICN).

Selección de Sujetos

[00326] Los siguientes criterios de elegibilidad se pueden usar para seleccionar sujetos para quienes el tratamiento con células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1 β se considera apropiado. Se tienen en cuenta todas las condiciones médicas y no médicas relevantes al decidir si este protocolo de tratamiento es adecuado para un tema en particular.

[00327] Los sujetos deben cumplir con las siguientes condiciones para ser elegibles para el protocolo de tratamiento:

- Hombres y mujeres, de al menos 18 años de edad o más.
- Diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2.
- Úlcera del pie diabético con gravedad de Grado 1 (solo grosor completo) o Grado 2 en la escala de Clasificación de Wagner de más de un mes de duración que no ha respondido adecuadamente a la terapia convencional para úlceras.
- Sujetos que cumplen uno o más de los siguientes criterios de insuficiencia arterial en el pie con la lesión de la úlcera:

a. Enfermedad arterial periférica con $ABI \geq 0.4$ y ≤ 0.8 o $TBI \geq 0.30$ y ≤ 0.65 .

b. Medida de oxígeno transcutáneo (TcPO₂) entre 20-40 mmHg.

- No hay revascularización o amputación planificada en los próximos 3 meses después de la visita de selección.
- La dosificación no debe comenzar hasta al menos 14 días después de una intervención de reperfusión fallida y al menos 30 días después de una intervención de reperfusión exitosa.

[00328] Los sujetos que tienen una o más de las siguientes condiciones se pueden excluir del protocolo de tratamiento:

- Cualquier condición médica significativa, anormalidad de laboratorio o enfermedad psiquiátrica que impida que el sujeto participe en el estudio.
- Cualquier condición, incluida la presencia de anomalías de laboratorio, que coloca al sujeto en riesgo inaceptable si él o ella participaran en el estudio.
- Mujeres embarazadas o lactantes.
- Sujetos con un índice de masa corporal > 40 en el momento de la selección.
- Tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) <30 ml/min/1,73 m² en el momento de la selección calculada usando la ecuación de Modificación de Dieta en Estudio de Enfermedad Renal (Levey, 2006) o la historia de disminución del eGFR > 15 ml/min/1,73 m² en el último año.
- Infección crónica no tratada o el tratamiento de cualquier infección con antibióticos sistémicos, incluido el sitio de la úlcera, deben estar libres de antibióticos 1 semana antes de la administración de IP.
- Osteomielitis, infección o celulitis conocidas en o adyacentes a la lesión de la úlcera.
- Dolor en extremidades en reposo debido a la isquemia de las extremidades.

- Hipertensión no controlada (definida como presión arterial diastólica > 100 mmHg o presión arterial sistólica > 180 mmHg durante la selección en 2 mediciones independientes tomadas mientras el sujeto está sentado y en reposo durante al menos 5 minutos).
- 5 • Diabetes mellitus mal controlada (hemoglobina A1c > 12% o una prueba de glucosa en suero de ≥ 300 mg/dl).
- Retinopatía proliferativa no tratada.
- Antecedentes de arritmia ventricular maligna, angina de pecho CCS clase III-IV, infarto de miocardio/intervención coronaria percutánea (PCI)/injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG) en los 6 meses previos a la firma del formulario de consentimiento informado (ICF), revascularización coronaria pendiente en los siguientes 3 meses, ataque isquémico transitorio/accidente cerebrovascular en los 6 meses previos, antes de firmar la ICF y/o insuficiencia cardíaca congestiva de etapa III o IV de la Asociación Cardíaca de Nueva York [NYHA].
- 10 • ECG anormal: nuevo bloqueo de rama derecha (BBB) ≥ 120 ms en los 3 meses anteriores a la firma del ICF.
- Hipercoagulación no controlada.
- Esperanza de vida inferior a 2 años en el momento de la firma de la ICF debido a enfermedades concomitantes.
- 20 • En opinión del investigador, el sujeto no es apto para la terapia celular.
- Antecedentes de malignidad dentro de los 5 años anteriores a la firma de la ICF, excepto el carcinoma de células basales o de células escamosas de la piel o el historial remoto de cáncer que ahora se considera curado frotis de Papanicolaou curado o prueba de Papanicolaou positiva con posterior seguimiento negativo.
- 25 •

- Historial de hipersensibilidad a cualquiera de los componentes de la formulación del producto (incluidos productos bovinos o porcinos, dextran 40 y dimetilsulfóxido [DMSO]).
- El sujeto ha recibido un agente en investigación -un agente o dispositivo no aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) para uso comercializado en cualquier indicación- dentro de los 90 días (o 5 vidas medias, el que sea mayor) antes del tratamiento con terapia de estudio o la participación planificada en otro estudio terapéutico antes de la finalización de este estudio.
- El sujeto ha recibido un gen de investigación o terapia celular previa.

Resultado clínico

[00329] La eficacia de las células madre placentarias CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ estimuladas con IL-1 β en el tratamiento de DFU se confirma si se demuestra mejoría en uno o más puntos finales clínicos.

REIVINDICACIONES

1. Una célula adherente derivada de placenta estimulada aislada, donde dicha célula es adherente al plástico de cultivo tisular, y en donde dicha célula es
5 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ y CD200⁺, en donde dicha célula se ha puesto en contacto con una o más citoquinas proinflamatorias in vitro, y en donde dicha célula (1) promueve la proliferación de células endoteliales; (2) promueve la formación de brotes o estructuras similares a tubos en una población de células endoteliales; o (3) promueve la migración de células endoteliales.
- 10 2. La célula aislada de la reivindicación 1, en donde dicha célula es CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ y CD200⁺ como se determina por citometría de flujo.
3. La célula aislada de la reivindicación 1, en donde dicha citocina proinflamatoria es una o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α o INF- γ .
4. La célula aislada de la reivindicación 3, en donde dicha citocina
15 proinflamatoria es IL-1 β .
5. La célula aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha célula segrega factores tróficos a un nivel más alto que una célula adherente aislada derivada de placenta que no se ha puesto en contacto con dicha una o más citocinas proinflamatorias.
- 20 6. La célula aislada de la reivindicación 5, en la que dichos factores tróficos comprenden al menos uno de GM-CSF, G-CSF, IL-6, GRO, MCP-1, folistatina o IL-8.
7. La célula aislada de la reivindicación 5, en donde dichos factores tróficos comprenden GM-CSF, G-CSF, IL-6, GRO, MCP-1, folistatina e IL-8.
8. Una población aislada de células que comprende la célula de cualquiera
25 de las reivindicaciones 1-7.
9. La población aislada de células de la reivindicación 8, en la que al menos 50% de las células en dicha población son las células de la reivindicación 1.
10. La población aislada de células de la reivindicación 8, en la que al menos 90% de las células en dicha población son las células de la reivindicación 1.

11. Un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, que comprende administrar una población de las células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 a dicho individuo.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el método comprende administrar una población de las células de la reivindicación 1 a dicho individuo en una cantidad y durante un tiempo suficiente para una mejora detectable de uno o más síntomas de dicha enfermedad o trastorno.

13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde dicha enfermedad o trastorno es úlcera de pie diabético (DFU).

14. El método de la reivindicación 13, en donde dicha DFU es causada por y/o está asociada con enfermedad arterial periférica (PAD).

15. El método de la reivindicación 11, en donde dicha enfermedad o trastorno del sistema circulatorio es una enfermedad o lesión cardíaca.

16. El método de la reivindicación 11, en donde dicha enfermedad o trastorno es una interrupción del flujo sanguíneo en o alrededor de una extremidad.

17. El método de la reivindicación 16, en el que dicha interrupción del flujo sanguíneo en o alrededor de una extremidad es causada por una enfermedad arterial periférica (PAD) o una enfermedad vascular periférica (PVD).

18. El método de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad arterial periférica (PAD).

19. El método de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha enfermedad o trastorno es enfermedad vascular periférica (PVD).

20. El método de las reivindicaciones 11 a 19, en el que el método comprende administrar intramuscularmente una población de células de la reivindicación 1 a dicho individuo el día 1 y el día 8 a concentraciones de (i) 3×10^6 ; (ii) 1×10^7 ; o (iii) 3×10^7 de dichas células.

21. El método de las reivindicaciones 11 a 19, en el que el método comprende administrar intramuscularmente una población de células de la reivindicación 1 a dicho individuo los días 1, 29 y 57 a concentraciones de 3×10^6 ; o 3×10^7 de dichas células.

22. El método de las reivindicaciones 11 a 21, en el que uno o más signos de función cardíaca se detectan de manera detectable, donde dichos signos de función cardíaca son gasto cardíaco de tórax (CO), índice cardíaco (CI), presión de la arteria pulmonar en cuña (PAWP), índice cardíaco (IC), % de acortamiento fraccional (% FS), fracción de eyección (FE), fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI); diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo (LVEDD), diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo (DSVI), contractilidad (dP/dt), disminución del funcionamiento auricular o ventricular, aumento de la eficiencia de bombeo, disminución de la tasa de pérdida de la eficiencia de bombeo, una disminución en la pérdida del funcionamiento hemodinámico, o una disminución de las complicaciones asociadas con la miocardiopatía, en comparación con el individuo antes de la administración de células adherentes derivadas de la placenta.

23. Un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, que comprende administrar una población de las células de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 a dicho individuo, en donde uno o más signos de función cardíaca se mejoran de forma detectable, en el que dicho indicio de la función cardíaca: gasto cardíaco en el pecho (CO), índice cardíaco (IC), presión de la arteria pulmonar en cuña (PAWP), índice cardíaco (IC), % de acortamiento fraccional (% FS), fracción de eyección (EF), fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FC) LVEF); diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo (LVEDD), diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo (DSVI), contractilidad (dP/dt), disminución del funcionamiento auricular o ventricular, aumento de la eficiencia de bombeo, disminución de la tasa de pérdida de la eficiencia de bombeo, una disminución en la pérdida del funcionamiento hemodinámico, o una disminución de las complicaciones asociadas con la miocardiopatía, en comparación con el individuo antes de la administración de células adherentes derivadas de la placenta.

24. El método de la reivindicación 23, en el que el método comprende administrar una población de las células de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 a dicho individuo en una cantidad y durante un tiempo suficiente para una mejora detectable de uno o más de dichos indicios de función cardíaca.

25. El método de las reivindicaciones 23 o 24, en el que dicha enfermedad o trastorno del sistema circulatorio es una enfermedad o lesión cardíaca.

26. Un método para tratar a un individuo que tiene una interrupción del flujo sanguíneo en o alrededor de una extremidad, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de las células de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

27. El método de la reivindicación 26, en el que dicha interrupción del flujo sanguíneo en o alrededor de la extremidad es una enfermedad arterial periférica (PAD) o una enfermedad vascular periférica (PVD).

28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 27, en el que el método comprende además administrar un agente terapéutico adicional.

29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 28, en el que dicha administración es mediante trasplante, implantación, inyección, infusión o administración a través de un catéter.

30. Un método para producir una célula adherente estimulada derivada de placenta, en el que dicha célula es $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$ y $CD200^+$, el método que comprende poner en contacto una célula adherente derivada de placenta con una o más citoquinas proinflamatorias in vitro.

31. El método de la reivindicación 30, en el que la citocina proinflamatoria es una o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , o INF- γ .

32. El método de la reivindicación 30 o 31, en el que la citoquina proinflamatoria es IL-1 β .

33. Una composición farmacéutica que comprende una población de las células de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

34. Un kit de partes que comprende una población de las células de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

RESUMEN

Se proporcionan en la presente células madre placentarias estimuladas y métodos para tratar individuos que tienen enfermedades o trastornos del sistema circulatorio usando células placentarias estimuladas. La invención también proporciona
5 métodos para inducir la angiogénesis usando tales células estimuladas o poblaciones de células que comprenden tales células estimuladas.

Secreción de Factor de Crecimiento y Citoquina por PDAC

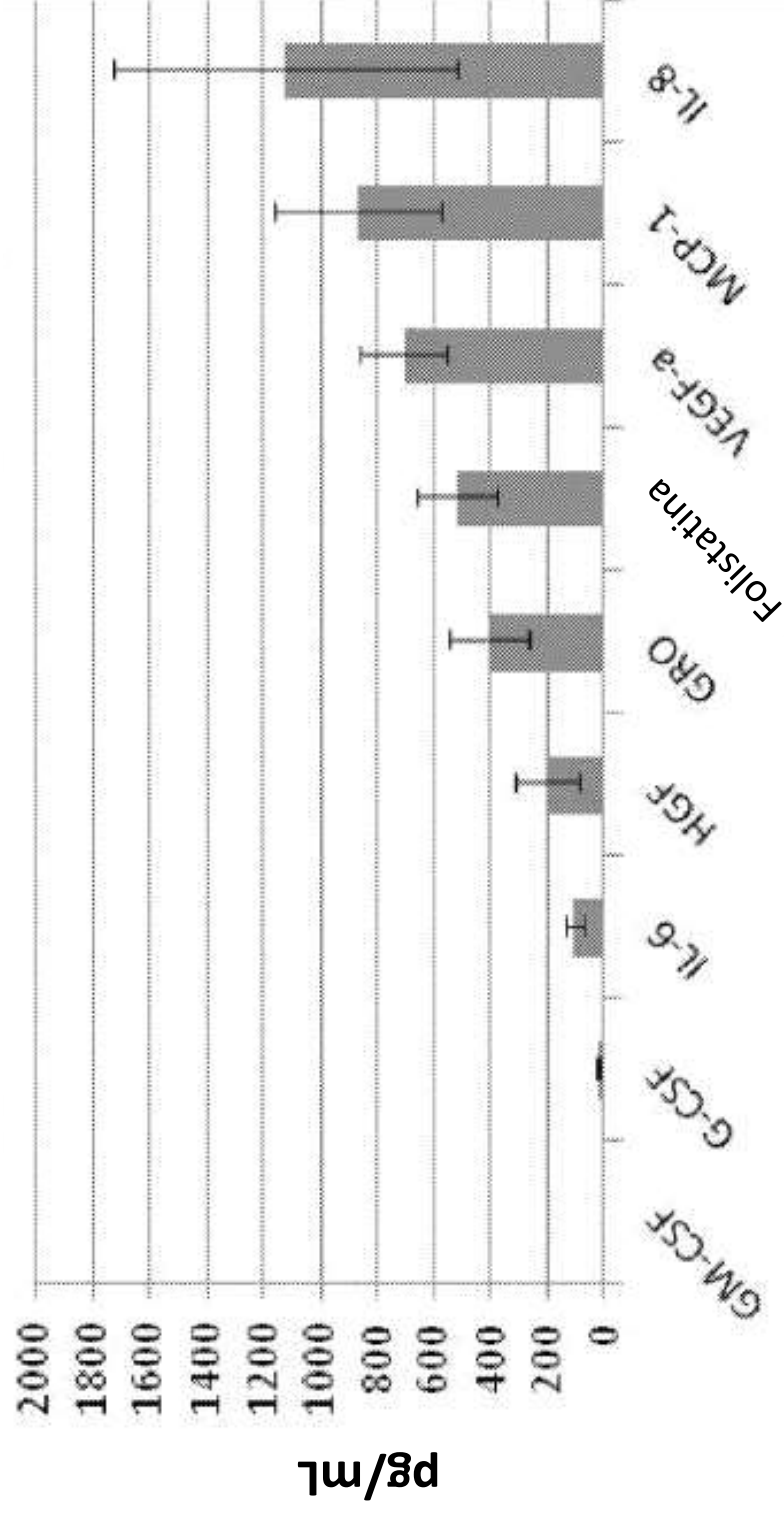
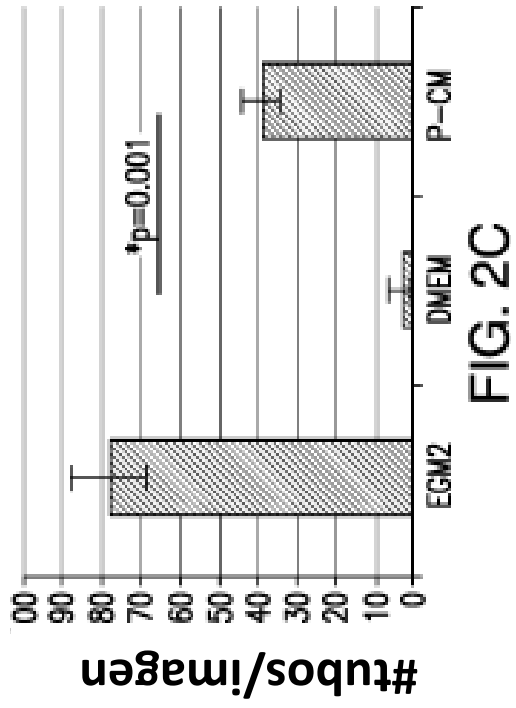
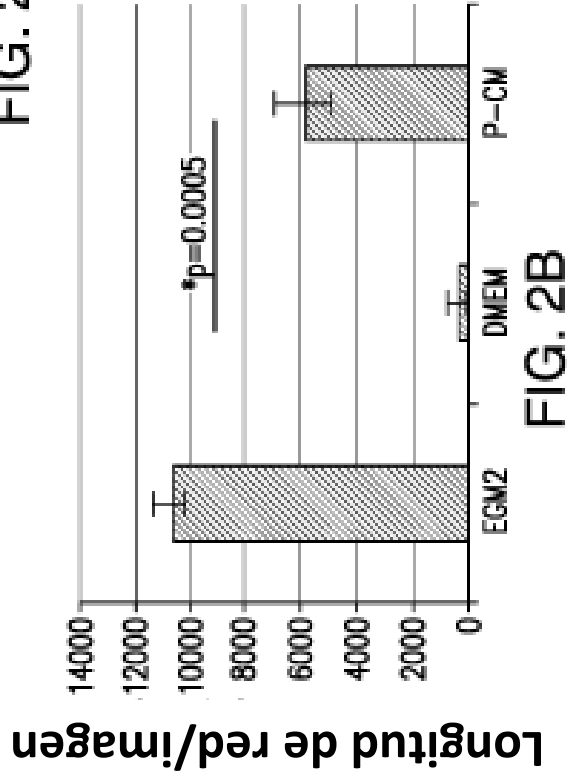
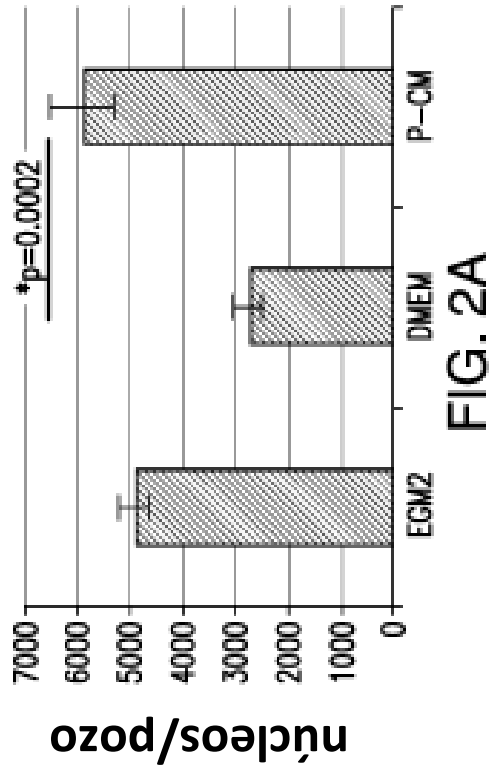


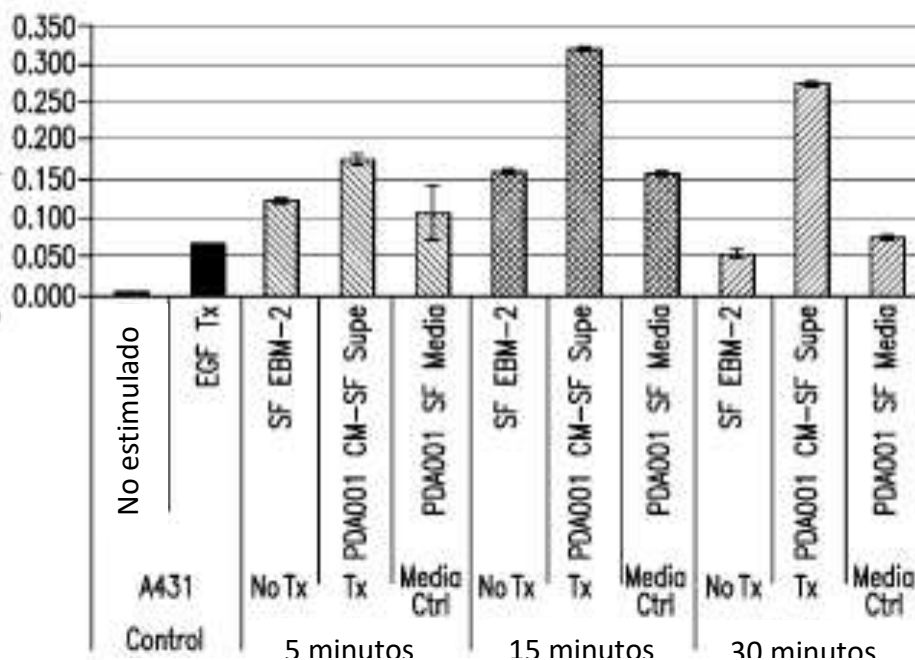
Fig. 1



Nivel de p-MEK1 relativo promedio

Nivel de p-ERK1/2 relativo promedio

Activación de HUVEC Fosfo-MEK1



Activación de HUVEC Fosfo-ERK1/2

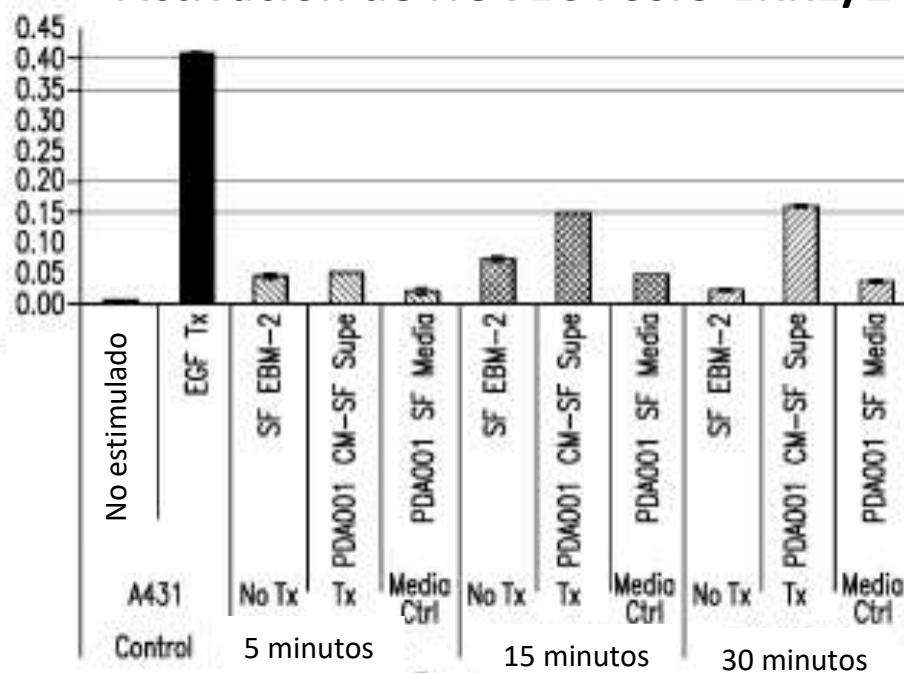


FIG. 3

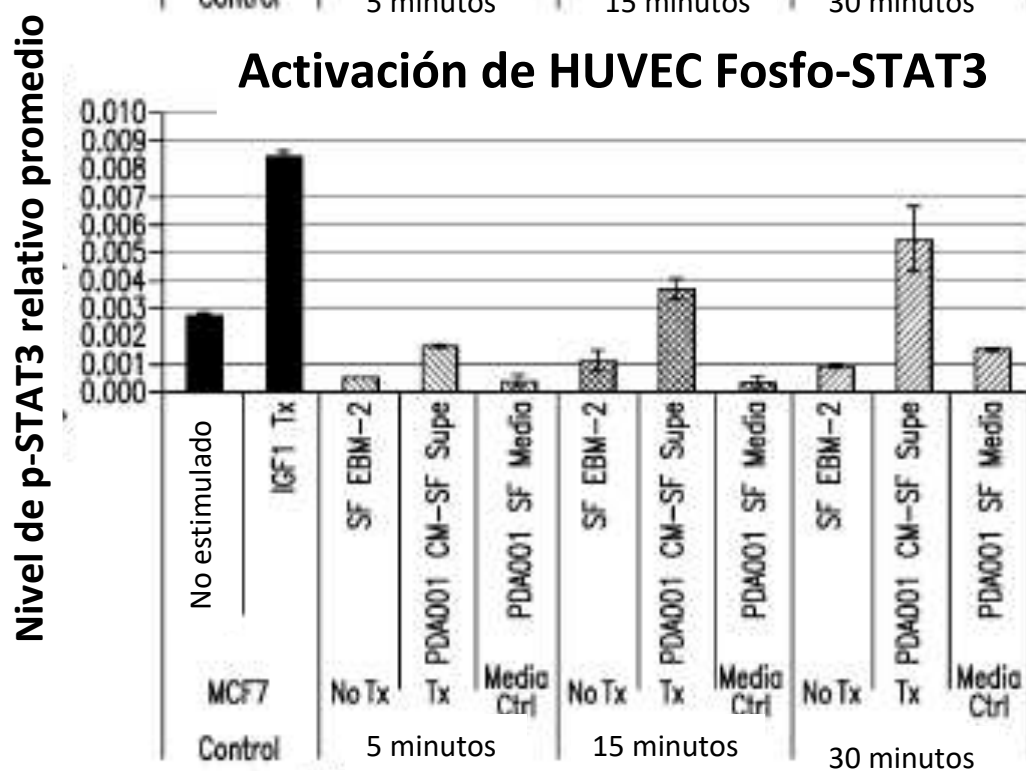
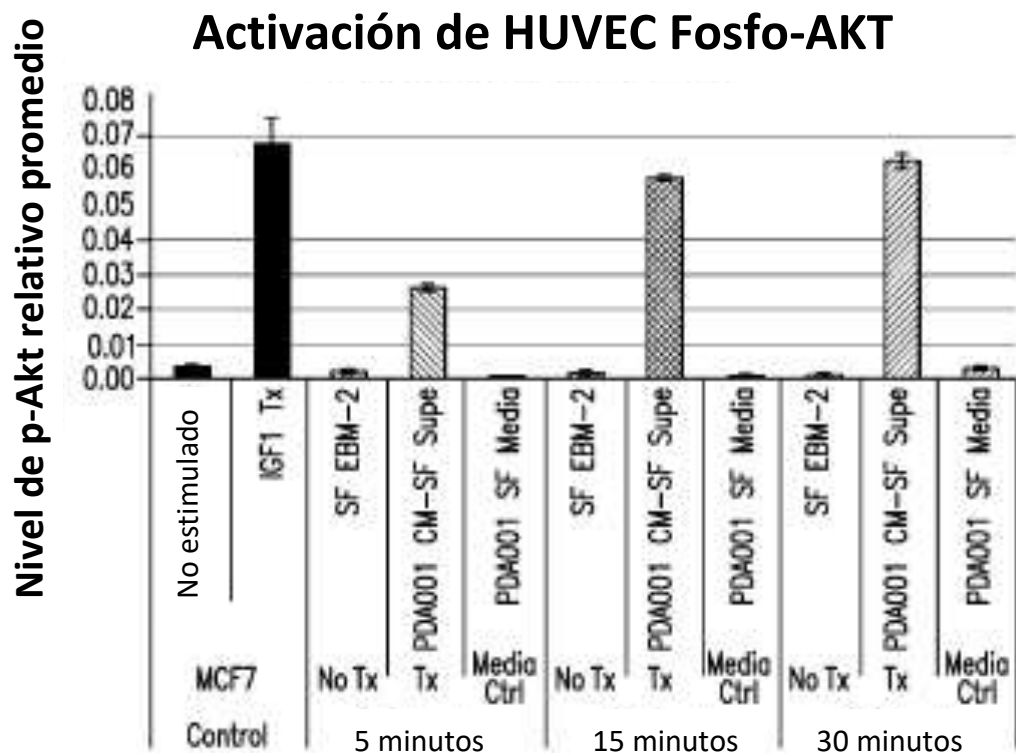


FIG. 3 (continuación)

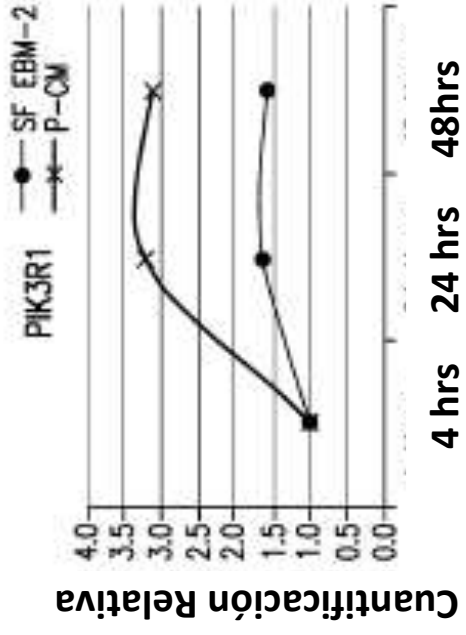
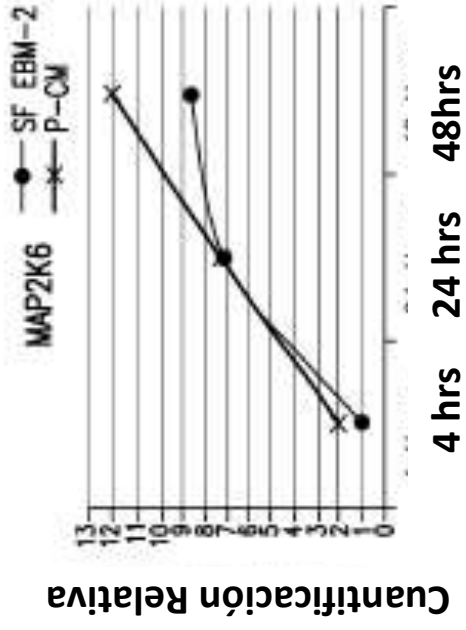
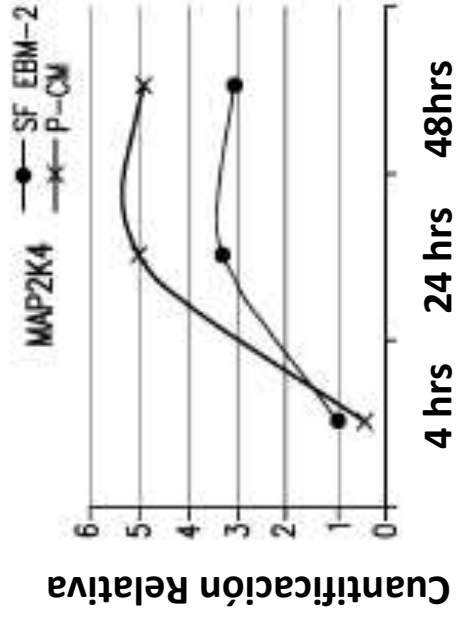
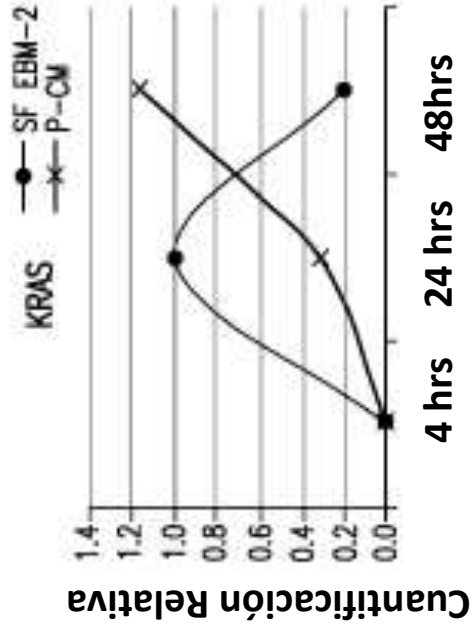


FIG. 4

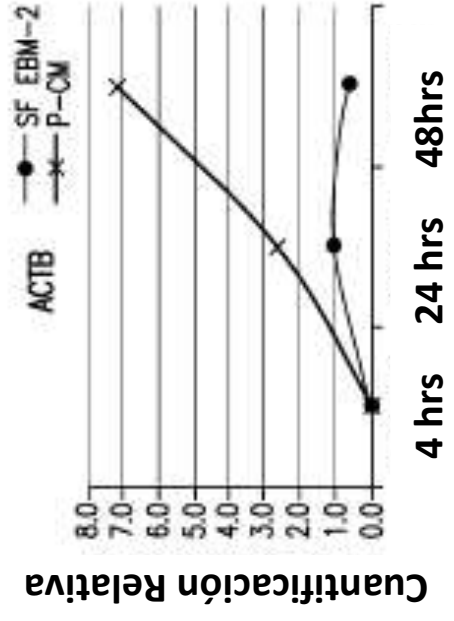
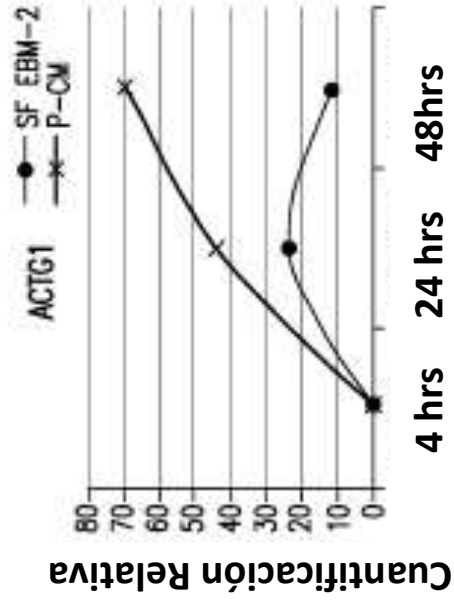
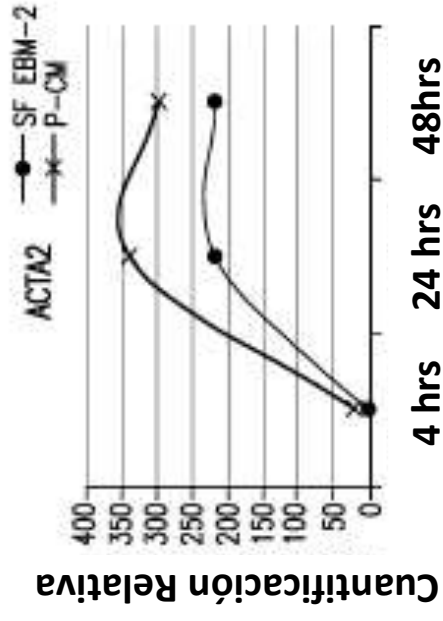
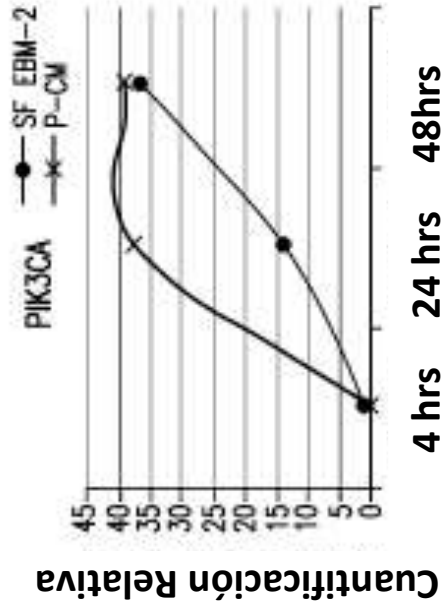


FIG. 4 (continuación)

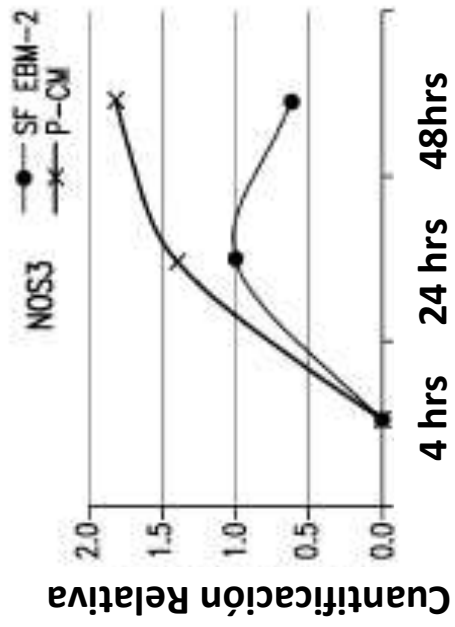
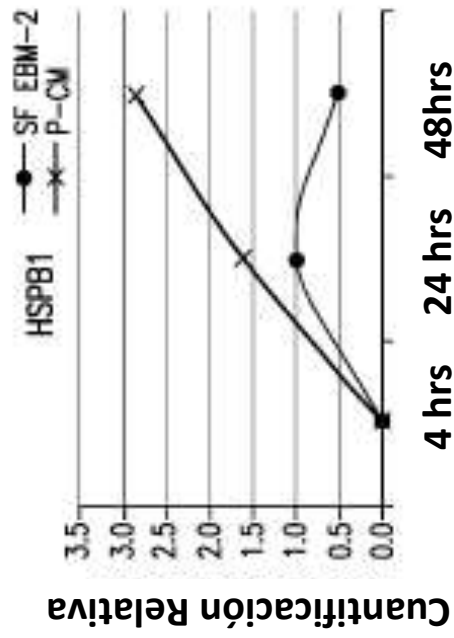
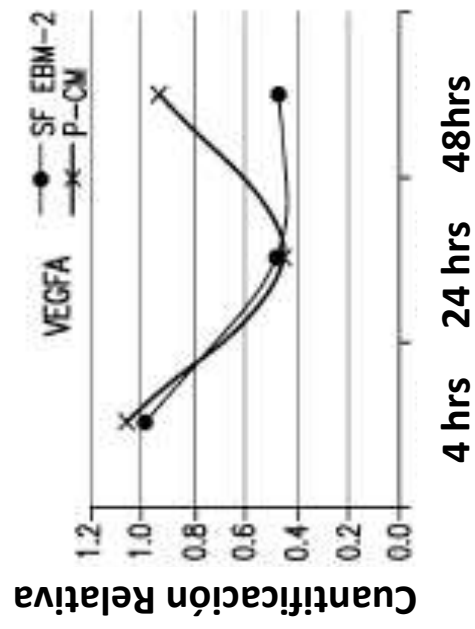
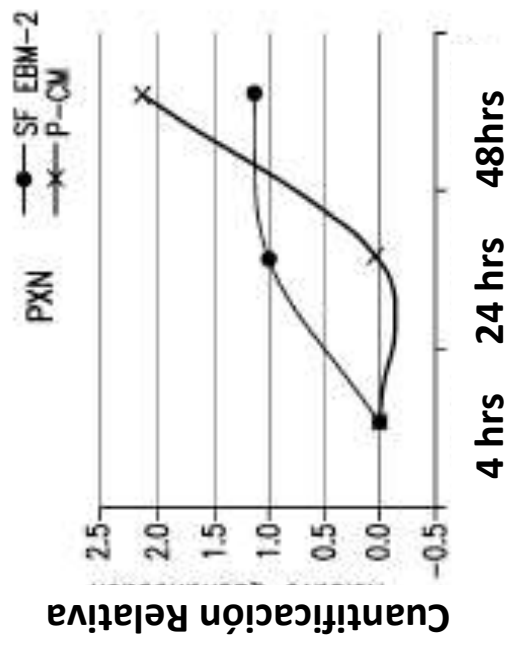


FIG. 4 (continuación)

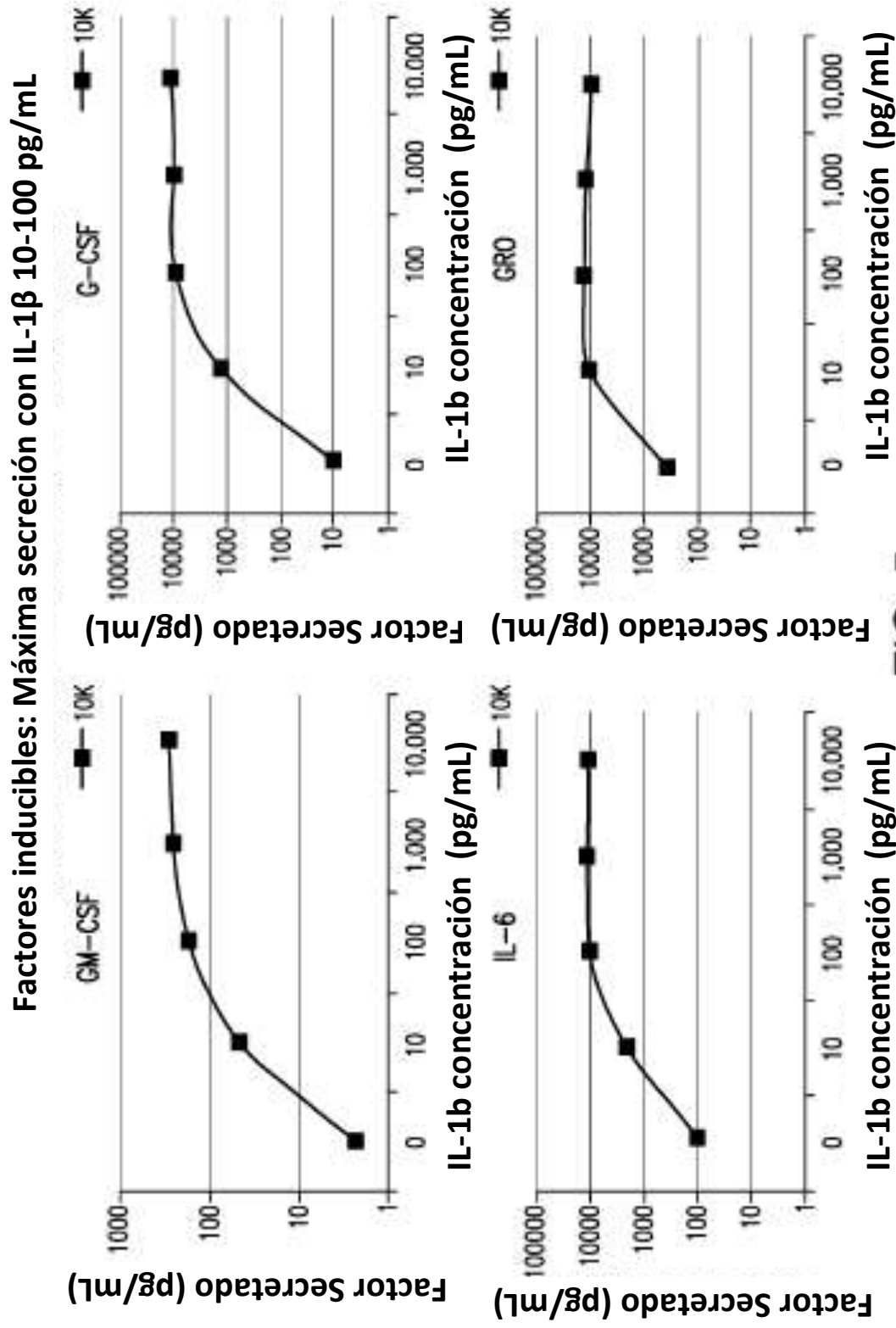


FIG. 5

Factores inducibles: Máxima secreción con IL-1 β 10-100 pg/mL

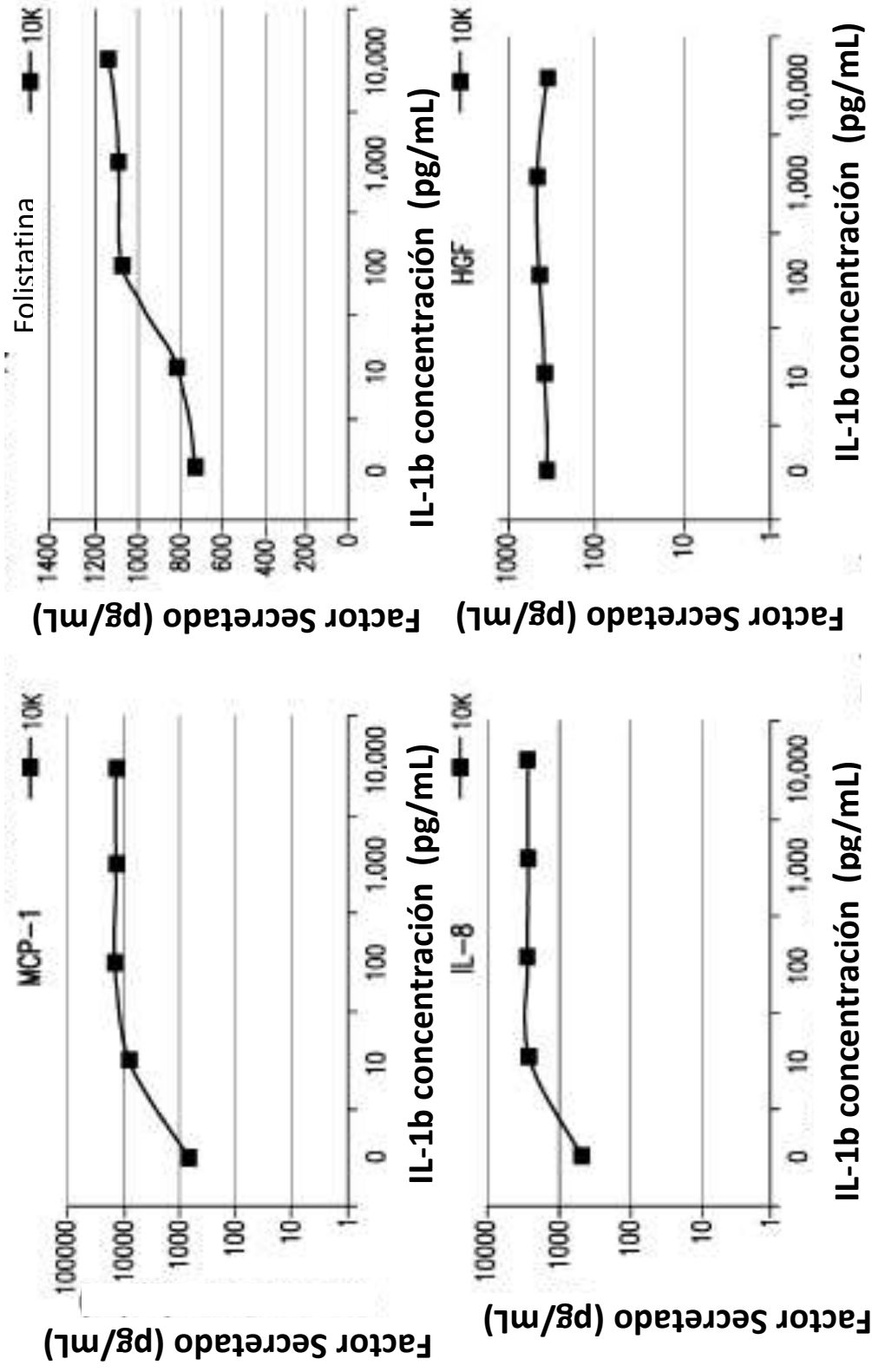


FIG. 5 (continuación)

Factores inducibles: Máxima secreción con IL-1 β 10-100 pg/mL

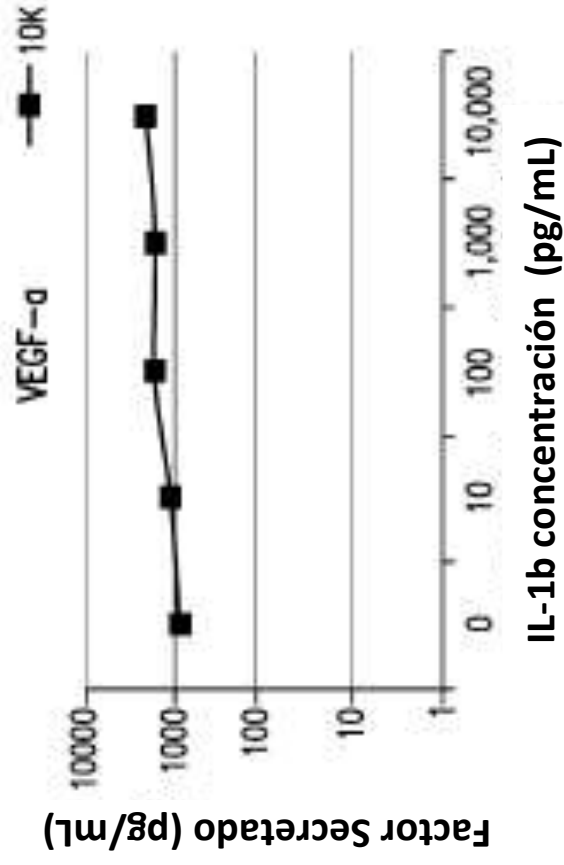
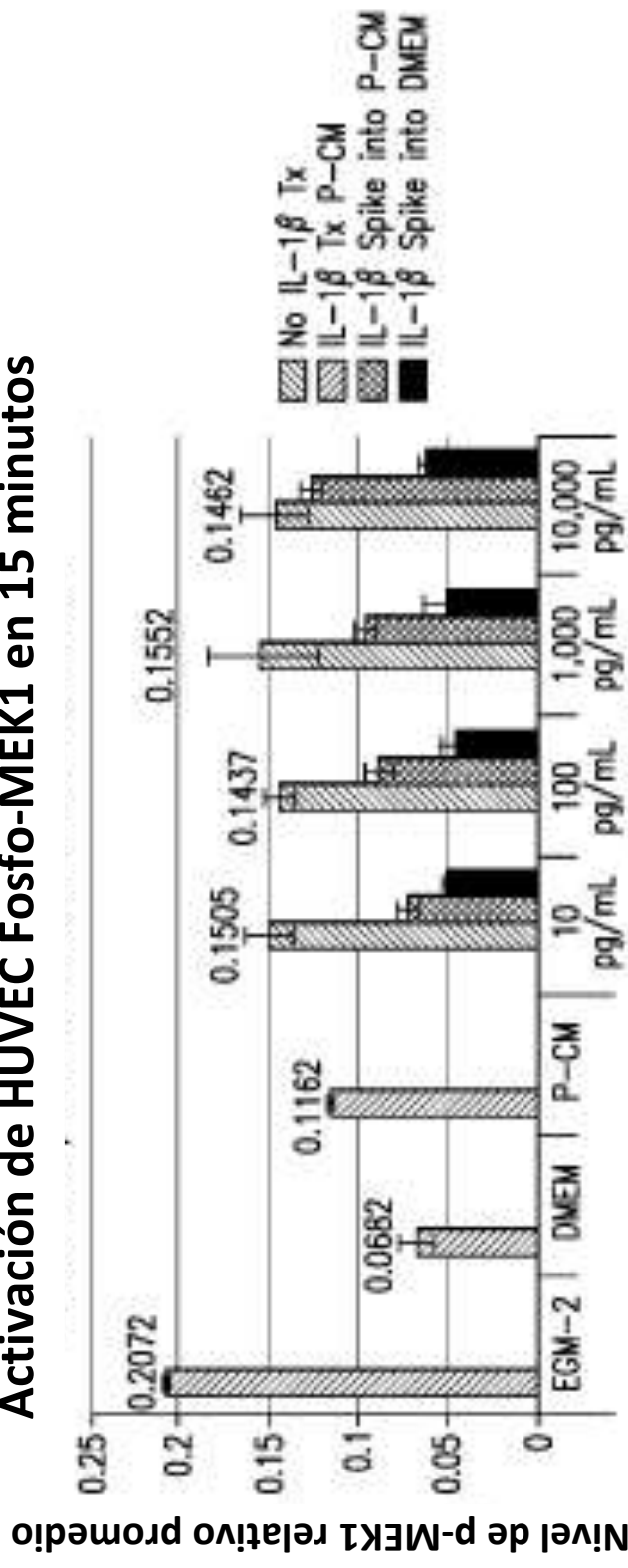


FIG. 5 (continuación)

Activación de HUVEC Fosfo-MEK1 en 15 minutos

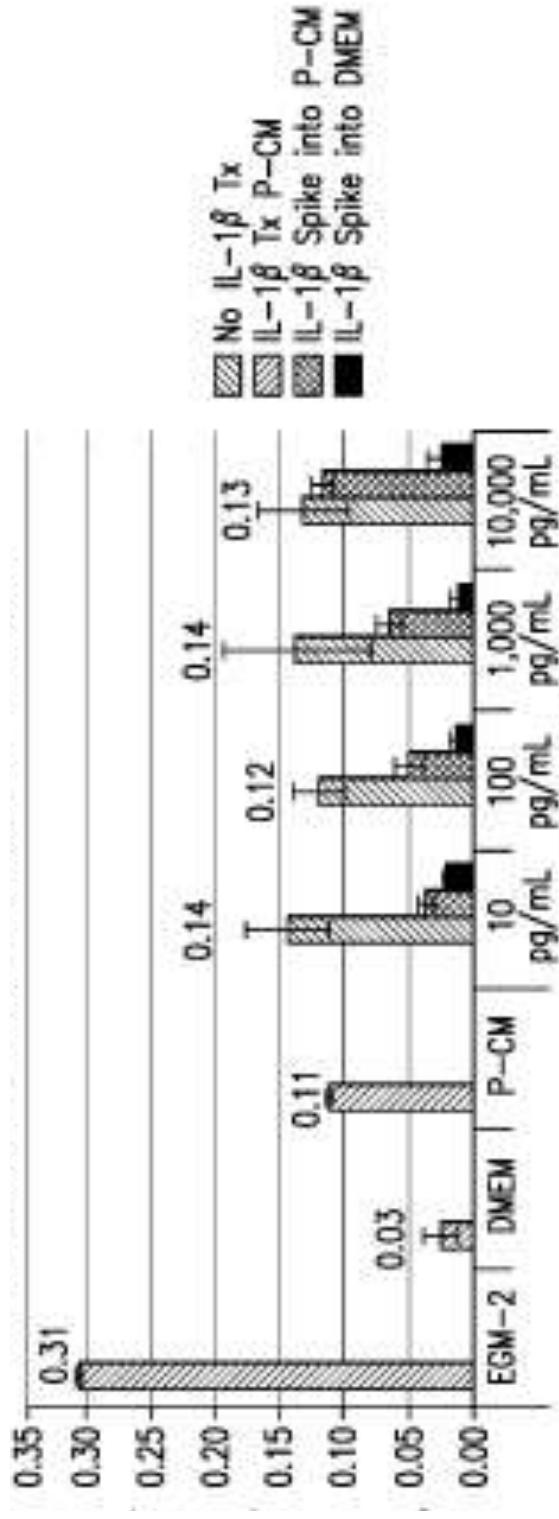


Estimulación IL-1β

FIG. 6

Activación de HUVEC Fosfo-ERK1/2 en 15 minutos

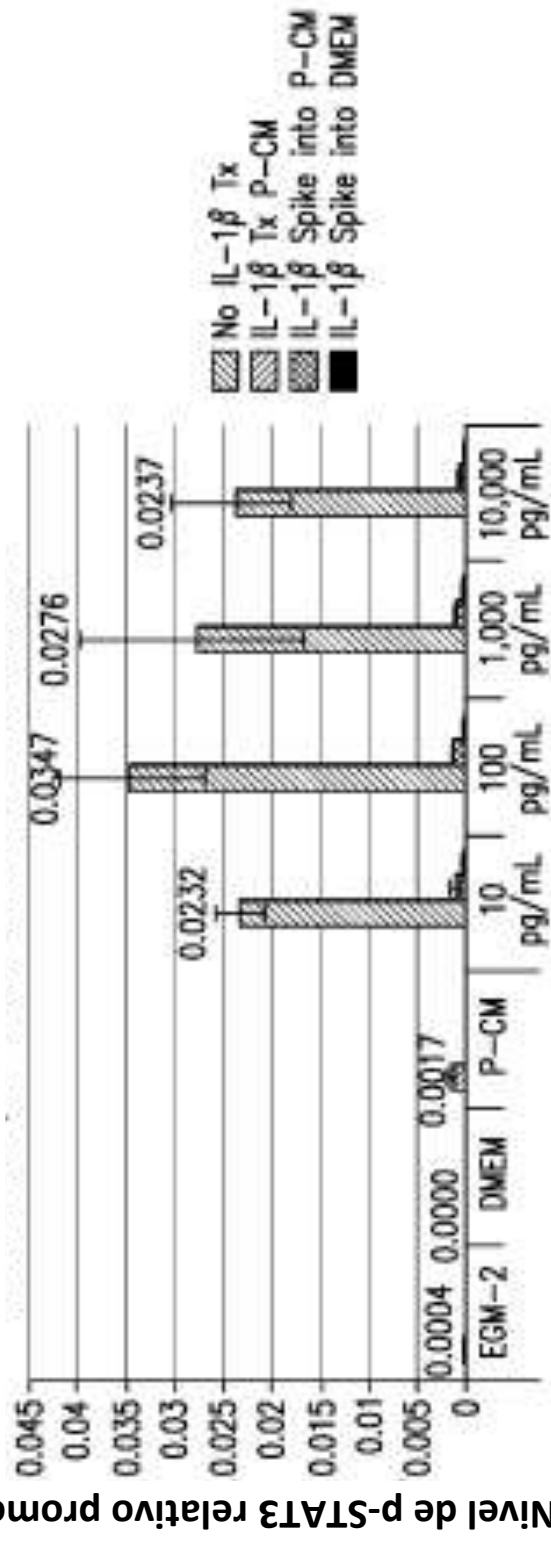
Nivel de p-ERK1/2 relativo promedio



Estimulación IL-1β

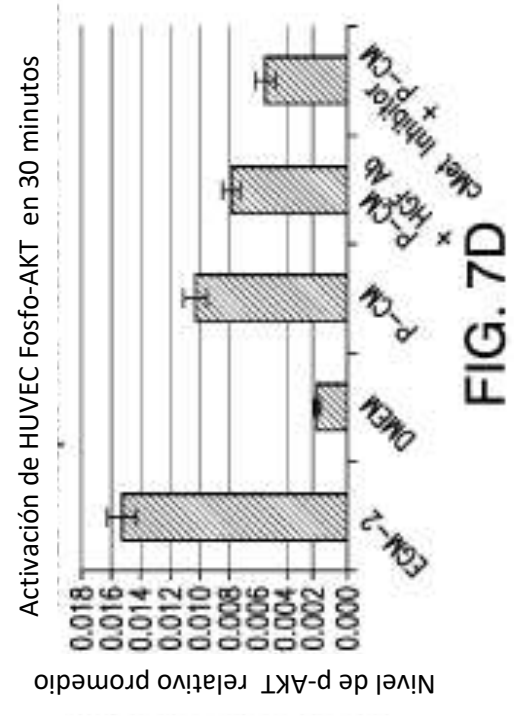
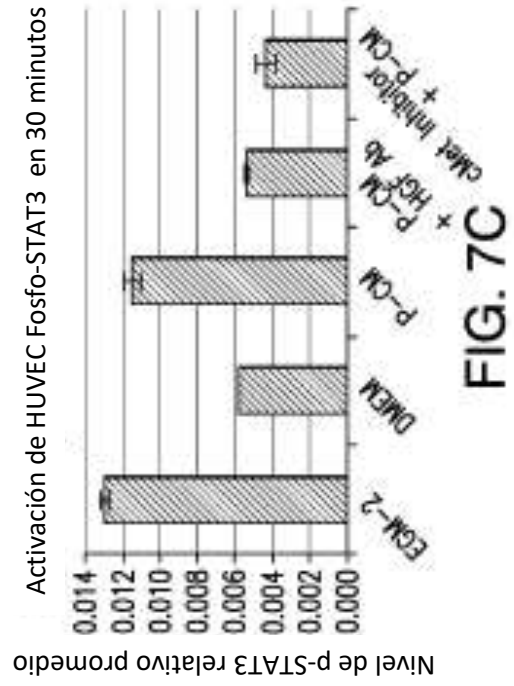
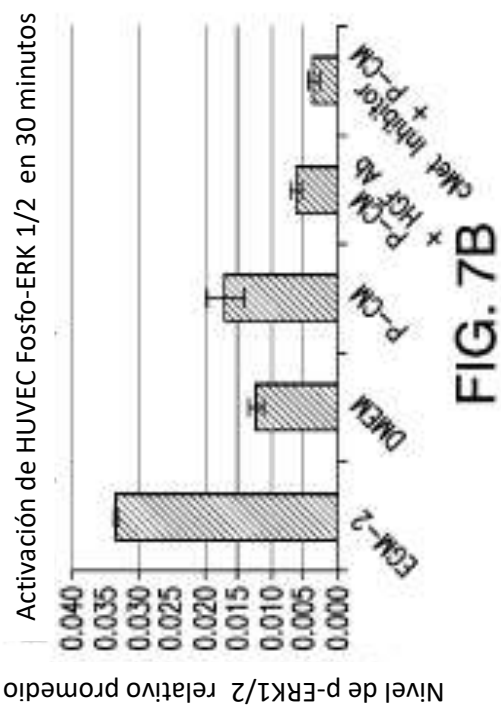
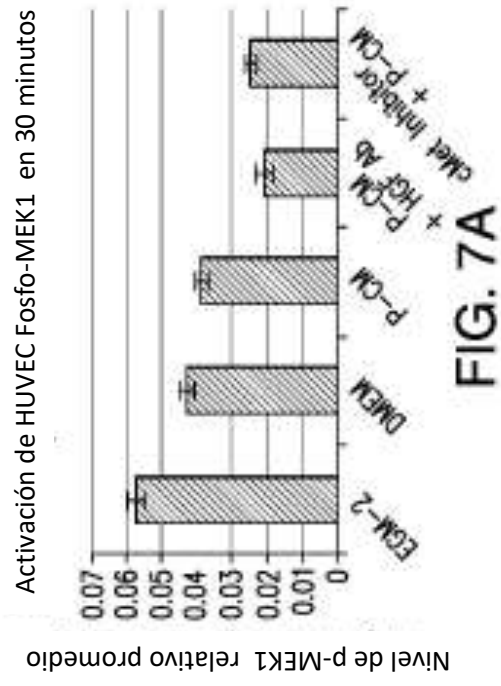
FIG. 6 (continuación)

Activación de HUVEC Fosfo-STAT3 en 15 minutos



Estimulación IL-1 β

FIG. 6 (continuación)



PCT

(PCT Rule 92*bis*.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SMITH, Timothy, L.
Celularity, Inc.
33 Technology Drive
Warren, NJ 07059
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 23 November 2017 (23.11.2017)	
Applicant's or agent's file reference 12827-839-228	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2016/034003	International filing date (<i>day/month/year</i>) 25 May 2016 (25.05.2016)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent ☐ the common representative
Name and Address ANTHROGENESIS CORPORATION 7 Powder Horn Drive Warren, NJ 07059 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:			
☐ the person	☒ the name	☒ the address	☐ the nationality ☐ the residence
Name and Address CELULARITY, INC. 33 Technology Drive Warren, NJ 07059 United States of America		State of Nationality	State of Residence
		US	US
		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
--

4. A copy of this notification has been sent to:		☐	the International Preliminary Examining Authority
☒	the receiving Office	☒	the designated Offices concerned
☐	the International Searching Authority	☐	the elected Offices concerned
☐	the Authority(ies) specified for supplementary search	☐	other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 89 65	Authorized officer Sanvincenti Guido e-mail pct.team2@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 02
--	---