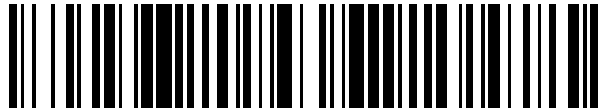


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 738**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2007 E 07776980 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2023717**

54 Título: **Método para recolectar células madre de sangre placentaria de cordón umbilical**

30 Prioridad:

11.05.2006 US 799734 P

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

07.09.2016

73 Titular/es:

**HLI CELLULAR THERAPEUTICS, LLC (100.0%)
4570 Executive Drive
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

TAKEBE, NAKO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Nuria

ES 2 581 738 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para recolectar células madre de sangre placentaria de cordón umbilical.

5 **Campo de la invención**

La presente materia objeto se refiere a un método eficiente para recolectar células madre hematopoyéticas de sangre placentaria del cordón umbilical.

10 **Antecedentes de la invención**

1. Campo de la invención

15 La presente materia objeto se refiere a la recolección de células madre de la placenta detallando un nuevo método que es clínicamente viable, cómodo y altamente eficiente. En particular, la presente materia objeto describe un nuevo hallazgo de que las células de sangre placentaria de cordón umbilical residuales recogidas por perfusión pulsátil automática están más enriquecidas con fenotipos de células madre hematopoyéticas primitivas en comparación con las extraídas con jeringa/aguja convencional o la
20 recolección mediante drenaje por gravedad y permite que las células sanguíneas de cordón umbilical se usen para fines de medicina regenerativa. El aumento del número de células madre obtenidas de una sola placenta usando el método descrito también puede mejorar los resultados del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas y obviar el uso de injertos dobles o triples de sangre de cordón umbilical de diferentes
25 donantes con el fin de compensar las células madre insuficientes a partir de un injerto de un solo donante.

2. Descripción de la técnica anterior

30 *Método de recolección de sangre de cordón umbilical y trasplante de sangre del cordón umbilical en adultos*

Las células de SC son una fuente prometedora de CMH para llevar a cabo el trasplante alogénico de CMH para las neoplasias malignas hematológicas y el síndrome de
35 insuficiencia de la médula ósea (Kurtzberg *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1996; Gluckman *et al.*, 1997; Rubinstein *et al.*, 1998). Entre las importantes ventajas se incluyen un rápido acceso a las células de se. que se almacenan en los bancos de se en todo el país, y la aceptación de 1-2 injertos mal apareados del antígeno leucocitario humano debido a la escasa frecuencia grave de la enfermedad del injerto contra huésped (EICH) en
40 comparación con los injertos de donantes no relacionados apareados (Barker *et al.*, 2002). Las células de SC permiten a los pacientes elegir un trasplante alogénico como una opción curativa de las neoplasias malignas hematológicas, en las que, de otro modo, no hay donantes apareados adecuados, en particular entre los pacientes de los grupos minoritarios. A pesar de las ventajas anteriores, el uso de SC está limitado en los adultos
45 debido a un número insuficiente de células, incluyendo las células CD34+ y progenitoras. El trasplante de SC usando niveles bajos de recuento total de células nucleadas conduce a importantes retrasos en el prendimiento tras el trasplante de neutrófilos y plaquetas o fallos del injerto (Wagner *et al.*, 2002; Laughlin *et al.*, 2004). Los procedimientos conocidos para la recolección de se incluyen el drenaje de la sangre por gravedad de la
50 placenta expulsada y el drenaje de la sangre por punción venosa en bolsas o jeringas de recogida.

Dado que los suministros de SC son apenas suficientes para un solo uso o, más recientemente, el uso de suministros dobles de se de dos donantes no idénticos, los trasplantes de se en adultos se han llevado a cabo en general bajo investigación clínica solo cuando donantes no relacionados adecuados no están disponibles. En la práctica, una recuperación de solo el 20-40 ml no es inusual y estas células de SC, por tanto, ni siquiera se usan o almacenan (Lasky *et al.*, 2002; George *et al.*, 2006). En tales casos, una cantidad significativa de células de SC no recolectadas aún permanecen en la placenta y se descartan ya que no hay método suplementario estandarizado que pueda recogerlas después de la cosecha inicial para complementarlo. Para expandir el futuro grupo de donantes para el banco de se. es importante investigar los métodos de recolección de se mejorados, incluyendo cómo recolectar las células de SC residuales que quedan después de la cosecha de SC convencional (Harris *et al.*, 1994). Más importante, la disponibilidad de una mayor cantidad de células de se de la misma placenta puede permitir el almacenamiento de una cantidad de células de SC suficiente para múltiples usos, incluyendo una copia de seguridad o la ingeniería de injerto como una expansión e inmunoterapia adoptiva *ex vivo*.

Conocimientos actuales de plasticidad de las CMH y regeneración de los tejidos

Durante la última década, en seres humanos se han identificado muchos tipos de células madre que tienen la capacidad de replicarse, autorenovarse y diferenciarse. Las células madre totipotenciales son capaces de formar todos los tipos de células del cuerpo y estas células están dentro del embrión temprano y son las denominadas células madre embrionarias humanas. Las células madre pluripotenciales son capaces de desarrollarse en el endodermo, el mesodermo o el ectodermo. Las células madre específicas de tejido están comprometidas a la formación de ciertos tejidos únicamente. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (CMH) son responsables de todos los tipos de células sanguíneas pero no de otros tipos de tejido y su presencia continuada en un adulto permite la capacidad de reparación. Sin embargo, los investigadores han descubierto que células como las CMH adultas que se consideraron responsables de la producción de diferentes tipos de células progenitoras hematopoyéticas incluso daban lugar a células del tejido u órgano diferentes, tales como las células neuronales o células musculares.

Los estudios de investigación sobre la transdiferenciación de las CMH adultas siguen siendo investigaciones polémicas y activas y están en marcha. En contraste, se han notificado un número de casos clínicos de los signos de generación de células no hematopoyéticas después de un trasplante de MO o de un trasplante cardíaco. Un estudio retrospectivo para buscar transdiferenciación de la MO en el cerebro después de un trasplante de MO mostró pruebas de neuropoyesis, detección de astrocitos y microglía en un escenario a largo plazo sin fusión celular (Cogle *et al.*, 2004). Otros informes han señalado la detección de células del donante en osteoblastos, hepatocitos, epitelio del tracto gastrointestinal (GI), estroma después del trasplante de MO; queratinocitos/hepatocitos/tracto GI/epitelios de la piel después del trasplante de células madre de sangre periférica; y cardiomiocitos con y sin endotelio después del trasplante cardíaco con una amplia gama de cantidades en porcentaje (Hruban *et al.*, 1993; Theise *et al.*, 2000; Korbling *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2002; Quaini *et al.*, 2002).

Células de sangre de cordón umbilical como fuente de células madre adultas

Aunque las células ME humanas pueden diferenciarse y expandirse *in vitro* para producir diferentes tipos de progenitores, su aplicación en los pacientes está frenada actualmente

por múltiples cuestiones éticas. Además, el tema de la pureza de las células progenitoras derivadas de células madre embrionarias tiene que resolverse. Por el contrario, se encontró que las poblaciones de células madre adultas derivadas de tejidos hematopoyéticos, incluyendo la médula ósea y las células de SC del cordón umbilical podían diferenciarse en el ectodermo o el endodermo tras la exposición a los estímulos adecuados (Eglitis y Mezey, 1997; Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000; Sanchez-Ramos *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2005). En particular, las células madre derivadas de SC tienen otras ventajas en comparación con las otras fuentes, ya que se obtienen de la placenta, que normalmente se desecha, por lo que no se produce daño tisular al huésped con la recogida de las células. En comparación con las células de la MO, las del SC tienen una ontogenia primitiva con el estado inmune intacto y longitud de los telómeros relativamente acortada.

Entre los debates sobre si existen las células madre somáticas verdaderamente pluripotenciales, las células derivadas de la SC y la placenta han atraído cada vez más la atención en cuanto a que contienen propiedades interesantes para la potencial explotación clínica. Recientemente, se ha demostrado que la SC contiene una población celular heterogénea y se ha reconocido como una fuente de células madre pluripotenciales (Goodwin *et al.*, 2001; Sanchez-Ramos *et al.*, 2001; Bicknese *et al.*, 2002; Sanchez-Ramos, 2002; Zigova *et al.*, 2002). Otros informaron de que la población de células adherentes aislada de un cultivo en suspensión de una semana de duración de células de se después de la depleción de células de linaje positivo expresaba signos inmunohistoquímicos de las características endodérmicas y ectodérmicas (McGuckin *et al.*, 2004). Hay una serie de informes sobre el éxito de trasplantes de se en niños que sufren el trastorno neurodegenerativo de leucodistrofia de Krabbe (Escolar *et al.*, 2005).

El presente inventor plantea la hipótesis de que estas características únicas que se encuentran en las células madre de SC pueden ser de un concepto emergente recientemente publicado DE que la placenta gestacional puede ser un nicho hematopoyético durante el desarrollo embrionario (Gekas *et al.*, 2005; Ottersbach y Dzierzak, 2005). Es una suposición simple que una placenta a término también puede contener células madre primitivas remanentes adherente al nicho vascular, o, posiblemente, debido a la tensión asociada con el "nacimiento", puede haber un mayor número de células madre que se liberan de la MO fetal o del hígado que han migrado al nicho de la placenta. Por lo tanto, el presente inventor plantea la hipótesis de que las células de SC derivadas de la placenta obtenidas por esta innovación pueden contener más células madre más primitivas (células similares a las células ME) que quedan como células madre remanentes depositadas en un nicho de lecho vascular de la placenta desde la embriogénesis.

Aislamiento y selección de las células de SC primitivas, incluyendo células similares a /as células ME y CMH primitivas

Para identificar marcadores de células madre comunes mediante el uso de análisis de comparación de patrones de expresión de células madre neurales y hematopoyéticas embrionarias, solo se identificó un gen (probablemente debido a dificultades técnicas (Fortunel *et al.*, 2003). Por lo tanto, para identificar y seleccionar las células madre todavía pueden ser necesarios varios marcadores para aislar estas células. Una de las características que se pueden utilizar para distinguir las células madre es la ausencia de marcadores de diferenciación. Este enfoque ha sido utilizado ampliamente en el campo de las CMH para llevar a cabo enriquecimiento de células madre para su uso en terapia.

Este rasgo "de linaje negativo (Lin-)" es una propiedad frecuente de muchas poblaciones de células madre (Cai *et al.*, 2004segundo). Para enriquecer aún más la población de células madre a partir de células de SC Lin-, se ha informado de que el marcador CD133+ demostró un alto potencial de proliferación sobre la estimulación del factor de crecimiento (Forraz *et al.*, 2004). Otros informaron de que la subpoblación CD133+/CD34- podría representar células madre más primitivas, ya que no produjeron células formadoras de colonias (CFC) en metilcelulosa, pero exhibieron la frecuencia más alta de de repoblación de SCID (Kuci *et al.*, 2003). Los marcadores de células madre embrionarias tales como el antígeno embrionario específico de etapa (SSEA) -3, SSEA-4, TRA-1 -60 y TRA-1-81 solo se expresan en las células ME que se han utilizado ampliamente en la caracterización de células madre pluripotenciales y anticuerpos compatibles para el análisis FACS (que están disponibles en el mercado). Más recientemente, Kucia *et al.* describieron una población de células madre primitivas llamada "células madre de tipo embrionario muy pequeñas (TEMP)", portadoras del fenotipo Lin-/CD45-/CXCR4+/CD133+/CD34+ (Kucia *et al.*, 2006). Estas células también fueron positivas para los factores de transcripción embrionarios Oct-4 y Nanog.

Como alternativa, el método que utiliza la presencia de marcadores metabólicos generales también se ha utilizado para identificar y aislar células madre. Uno de los marcadores metabólicos que se ha descrito es la aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Takebe *et al.*, 2001). El sustrato fluorescente de la ALDH, Aldefluor (StemCell), se ha utilizado para demostrar la mayor actividad de la ALDH en las células madre neurales (Cai *et al.*, 2004b; Corti *et al.*, 2006) y las CMH (Storms *et al.*, 1999). Este método de marcaje no tóxico en vivo se puede usar para identificar otras poblaciones de células madre, también (Cai *et al.*, 2004a). Adicionalmente, la captación de rodamina y el marcaje con colorante Hoechst se han utilizado para seleccionar poblaciones de células madre de MO, SC, mesenquimatosas, musculares y de cerebro adulto (Kim *et al.*, 2002; Bhattacharya *et al.*, 2003; Migishima *et al.*, 2003; Parmar *et al.*, 2003). La población lateral (PL) que se demuestra por la baja absorción de colorante Hoechst 33342 representa la más alta capacidad de autorenovación y pluripotencia más alta. La absorción del colorante Hoechst está regulada por un transportador de membrana ABCG2 y la población PL se define como la expresión de la proteína ABCG2 (Zhou *et al.*, 2001; Scharenberg *et al.*, 2002). La proteína ABCG2 también se expresa específicamente en las células madre neurales y disminuye la expresión cuando las células precursoras se diferencian (Cai *et al.*, 2002).

Evidencia de la transdiferenciación de células ectodérmicas de linaje de células hematopoyéticas humanas

Cada vez hay más informes progenitoras derivadas del estroma de MO que se diferencian en células neuronales, ya que estas células se notificaron por primera vez que mostraban diferenciación en células musculares, células gliales, y en hepatocitos de ratón (Azizi *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999). Las pruebas *in vitro* de inducciones de proteínas específicas de neuronas, tales como nestina, proteína nuclear específica de neuronas (NeuN) y proteína fibrilar ácida glial (GFAP) en células derivadas de células estromales de MO humanas y de roedor se notificaron después de la estimulación con ácido retinoico, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000). Entre los progenitores hematopoyéticos no mesenquimatosos, varios informes han demostrado que se indujeron las células mononucleares de SC humana, incluyendo células CD133+ separadas para que expresaran marcadores neuronales y gliales *in vitro* tales como beta-

tubulina III, GFAP después de la exposición al factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y hEGF, y también Musashi-1 tras la exposición al ácido retinoico y al factor de crecimiento nervioso (NGF) (Sanchez-Ramos *et al.*, 2001; Bicknese *et al.*, 2002).

5

Evidencia de la transdiferenciación de células endodérmicas de linaje de células hematopoyéticas

Anteriormente se pensaba que los hepatocitos se transformaban a partir de células de MO infundidas en un modelo de ratón (Lagasse *et al.*, 2000), pero se encontró que se produce por la fusión de células en dicho modelo de regeneración hepática en particular (Wang *et al.*, 2003b). Otros también encontraron que las células mielomonocíticas de CMH de MO eran la principal fuente de parejas de fusión de hepatocitos (Camargo *et al.*, 2004). Las células de SC aisladas a partir de un procedimiento de depleción de células de linaje positivo seguido de una semana de cultivo en suspensión forman una población de células adherentes que se encontró que expresaban marcadores de células hepáticas después de una incubación adicional con medio de crecimiento de hepatocitos (McGuckin *et al.*, 2005). Se notificaron pruebas del desarrollo de células de tipo hepatocitos en el hígado tratado con CCl₄ en ratones inmunológicamente deficientes tras el trasplante de CD34+.CD38-CD7- de SC (Wang *et al.*, 2003a) y, más recientemente, en un modelo sin lesiones usando hepatocitos de oveja fetal, humanos se generaron mediante reconstitución de la MO de oveja fetal con CMH humanas, incluyendo células CD34+/Lin-, CD34-/Lin-, CD34+/Lin-/CD38-, CD34-/Lin-/CD38-, CD34+/Lin-/CD133+, CD34+/Lin-/CD133- derivadas de MO, sangre periférica o SC (Almeida-Porada *et al.*, 2004).

El artículo "A Modified Cord Blood Collection Method Achieves Sufficient Cell Levels for Transplantation in Most Adult Patients" de R. Bornstein *et al.*, *Stem Cells* 2005; 23, pp. 324-334, describe un método modificado de dos etapas de recogida de la placenta/cordón umbilical en el que una fracción de sangre estándar obtenida por punción venosa umbilical se combina con una segunda fracción recogida después de perfusión placentaria con 50 ml de solución salina al 0,9% heparinizada.

Sumario de la invención

35

La presente materia objeto se refiere a un método de recolección de sangre del cordón umbilical (SC) derivada de células madre hematopoyéticas a partir de una placenta según la reivindicación 1. La perfusión placentaria se realiza mediante una máquina de perfusión placentaria pulsátil (PMPP). En el método de acuerdo con la reivindicación 1, la PPM se combina con ausencia de recogida anterior. Como alternativa, la PMPP se puede combinar con realización de un método de recogida convencional, por lo general punción venosa (aspiración de la vasculatura del cordón umbilical con una aguja y jeringa) o drenaje por gravedad. La PMPP se puede realizar con una solución de perfusión de órganos que contiene anticoagulante para lavar las células de sangre de cordón y posteriormente recoger el líquido de perfusión resultante que contiene las células madre. Este método no requiere ninguna preparación o la inyección de anticoagulantes en la placenta tras el parto para prevenir la coagulación. La placenta aislada puede enfriarse, por ejemplo, mediante la colocación en hielo, antes de la perfusión. Si la perfusión se realiza en el plazo de una hora desde el aislamiento de la placenta, la placenta no tiene que enfriarse antes de la perfusión. El método descrito en el presente documento todavía se puede realizar si la placenta se prepara o se inyecta con un anticoagulante antes de

50

realizar la perfusión. Si las células de sangre de cordón se recogen primero usando métodos convencionales, las células de sangre de cordón residuales obtenidas con PMPP se pueden añadir a esta recogida inicial. Las células de sangre de cordón obtenidas por PMPP también se pueden almacenar como células de reserva o conservar para fines de futura ingeniería de injerto celular y de medicina regenerativa. La comodidad de no necesitar la extracción inmediata de las células madre del cordón umbilical de la placenta y la posibilidad de enviarla directamente en hielo solo sin ninguna preparación adicional a una instalación central hace que este método sea potencialmente atractivo para su incorporación en el sistema de bancos de células de sangre de cordón actualmente establecido.

La perfusión comprende someter a la placenta de mamífero no exanguinada a un flujo mediado por presión de solución de perfusión, comprendiendo el flujo mediado por presión de la solución de perfusión un flujo pulsátil de la solución de perfusión. El flujo mediado por presión de la solución de perfusión puede comprender uno o más de un flujo mediado por presión positiva de la solución de perfusión o un flujo mediado por presión negativa de la solución de perfusión.

La perfusión se puede llevar a cabo en condiciones suficientes para producir una placenta de mamíferos sustancialmente libre de células madre de sangre de cordón. La perfusión placentaria se puede realizar utilizando una bomba peristáltica.

El método implica el aislamiento de células madre hematopoyéticas presentes en la sangre del cordón umbilical de una placenta aislada. Como alternativa, las células madre aisladas pueden comprender células madre de tipo células madre embrionarias (ME), células madre mesenquimatosas o combinaciones de las mismas. Otras células de sangre de cordón que se pueden obtener incluyen células T, monocitos, células dendríticas y células B.

El procedimiento puede además comprender: antes de la perfusión, el aislamiento de una placenta de mamífero de un donante mamífero para producir una placenta de mamífero aislada; y el enfriamiento de la placenta de mamífero aislada para producir una placenta de mamífero enfriada.

En una realización, la placenta aislada se mantiene en hielo después de la extracción, y antes de la perfusión. La placenta aislada enfriada puede mantenerse a una temperatura que varía de aproximadamente $> 0^{\circ}\text{C}$ a aproximadamente 6°C , o de aproximadamente 1°C a aproximadamente 4°C , siempre que la placenta no se congele, antes de realizar la perfusión. Como alternativa, la placenta puede mantenerse a una temperatura que varía de aproximadamente 4°C a aproximadamente 10°C durante cuatro horas, antes de realizar la perfusión. La placenta también puede mantenerse a 4°C , antes de realizar la perfusión. La placenta enfriada aislada puede mantenerse durante un periodo de tiempo de hasta aproximadamente 40 horas, después de la extracción y antes de la perfusión.

El método puede no requerir la administración o la inyección de un anticoagulante en la placenta antes de la perfusión. Por lo tanto, la placenta no se puede administrar o inyectar con un anticoagulante antes de la perfusión.

La solución de perfusión puede comprender una solución fisiológicamente compatible Belzer (RPMI de IMDM para uso no humano) o la solución de perfusión puede comprender un anticoagulante. En una realización, la solución de perfusión comprende

heparina como anticoagulante. Como alternativa, se puede usar creatina fosfato dextrosa (CPDA), o una combinación de heparina y creatina fosfato dextrosa (CPDA).

5 En una realización no cubierta por el método de acuerdo con la reivindicación 1, la placenta puede exanguinarse parcialmente antes de realizar la perfusión placentaria. En general, la sangre del cordón umbilical puede exanguinarse de la placenta utilizando métodos estándar tales como punción venosa (por ejemplo, mediante aguja y jeringa) o drenaje por gravedad (por ejemplo, con aguja y bolsa).

10 En general, las células madre pueden aislarse de la sangre de cordón exanguinado de la placenta mediante tales métodos estándar. Las células madre aisladas de la placenta exanguinada usando métodos estándar se pueden combinar con las células madre aisladas utilizando el método de perfusión de la invención. Las células madre combinadas de ambos métodos se pueden utilizar para derivar adicionalmente la ontogenia de células madre.

En una realización, la placenta se perfunde a través de una o dos de las arterias umbilicales.

20 La placenta puede perfundirse y la sangre del cordón umbilical extraída puede comprender células madre viables, hasta aproximadamente 40 horas después del parto. La placenta puede perfundirse y la sangre del cordón umbilical extraída puede comprender células madre viables, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 40 horas después del parto.

25 La PMPP de la placenta unida se puede realizar en un entorno de pulso de aproximadamente 15 -60 latidos/min. La PMPP de la placenta unida se puede realizar a una presión sistólica que varía de 15 a 70 mmHg. La PMPP de la placenta unida se puede realizar durante un tiempo que varía de 5 min a 90 min, tiempo durante el cual la sangre del cordón se extrae de la placenta. La PMPP de la placenta unida se puede realizar durante un tiempo que varía de 15 min a 35 min. La PMPP de la placenta unida se puede realizar durante un tiempo que varía de 20 min a 30 min. La PMPP de la placenta unida se puede realizar para una cantidad mínima de tiempo seleccionada de al menos 10 min, al menos 15 min, al menos 20 min, al menos 25 min, al menos 30 min, al menos 40 min, al menos 50 min y al menos 60 min, en el que el tiempo máximo de perfusión no es mayor de 90 minutos para la cantidad mínima de tiempo seleccionada.

40 Los fenotipos de células madre hematopoyéticas primitivas aisladas pueden comprender uno o más de células CD34+/CD38-, células CD133+, células CD133+/CD34+, células CD133+/CD34-, células CD117+, células CD90+, células CD59+, células Thy1+, células Lin-, células CXCR4+, células ALDH^{high}, células de la población lateral (PL), células SSEA-3+, células SSEA-4+, células TRA-1-60, células TRA-1-81 o combinaciones de las mismas. Las células madre aisladas pueden comprender fenotipos de células madre hematopoyéticas primitivas que pueden diferenciarse en células que no sean células CD34+/CD38-, células CD133+, células CD133+/CD34+ o células CD133+/CD34-.

50 El líquido de perfusión de la PMPP más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional, tal como una aguja y una jeringa, puede dar lugar a un incremento de 1,5 veces del recuento de células mononucleares totales obtenido de una placenta en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y jeringa solo. Es

posible una recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.

5 El líquido de perfusión de la PMPP más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional, tal como una aguja y una jeringa, pueden dar lugar a un incremento de 5,5 veces del porcentaje de células CD34+ obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y jeringa solo. Es posible una recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.

15 El líquido de perfusión de la PMPP más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional, tal como una aguja y una jeringa, pueden dar lugar a un incremento de 4,9 veces de las células CD34+ totales obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y jeringa solo. Es posible una recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.

20 El líquido de perfusión de la PMPP más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional, tal como una aguja y una jeringa, pueden dar lugar a un incremento de 14,8 veces del porcentaje de células CD34+/CD38- obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y jeringa solo. Es posible una recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.

30 El líquido de perfusión de la PMPP más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional, tal como una aguja y una jeringa, pueden dar lugar a un incremento de aproximadamente 11 veces de las células I CD34+/CD38- recogidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y jeringa solo. Es posible una recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.

35 El líquido de perfusión de la PMPP más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional, tal como una aguja y una jeringa, pueden dar lugar a un enriquecimiento por 5 veces del porcentaje de células CD133+ obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y jeringa solo. Es posible una recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.

45 El líquido de perfusión de la PMPP más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional, tal como una aguja y una jeringa, pueden dar lugar a una población de células 7 CD133+ aproximadamente 7 veces mayor obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y jeringa solo. Es posible una recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.

50

Las células madre del cordón umbilical pueden someterse a criopreservación.

Breve descripción de las figuras

- 5 En la descripción detallada de la invención que se presenta a continuación, se hace referencia a los dibujos adjuntos en los que:

10 Figura 1. La máquina de perfusión placentaria pulsátil (PMPP) permite aumentar el recuento total de células mononucleares 1,5 veces por placenta (fracción de venopunción más fracción de PMPP) en comparación con la punción venosa sola. La figura representa un análisis de las 8 muestras de SC derivada de placenta obtenidas por el método de punción venosa (negro) seguido del método de la máquina de perfusión placentaria (patrón de rayas). Los números arábigos debajo de cada barra representan los números de las muestras que se muestran en la Tabla 1. (Figura 1). Los datos en bruto se
15 presentan en la Tabla 3.

20 Figura 2. El porcentaje de la fracción de células CD34+ obtenidas mediante el método de PMPP contenía un porcentaje 4,9 veces mayor en comparación con la fracción obtenida mediante punción venosa.

25 Figura 3. El recuento de células CD34+ de la fracción obtenida por punción venosa y de la fracción obtenida por PMPP fue $7,4 \times 10^6 \pm 5,9 \times 10^6$ (media+ DE.) (intervalo de 8 pacientes, $1,1 - 18,2 \times 10^6$) y $28,8 \times 10^6 + 37 \times 10^6$ (media + DE.) (intervalo de $1,6 - 116 \times 10^6$), respectivamente, lo que indica que la fracción de PMPP contenía una cifra 3,9 veces mayor de células totales CD34+. Aguja y una jeringa, se traduce en un porcentaje de la población de células CD34+ 14,8 veces mayor obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y una jeringa solo. Es posible una recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.
30

35 En aún otra realización, el perfundido de la PMPP más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional, tal como una aguja y una jeringa, da lugar a un incremento de aproximadamente 11 veces de las células 1CD34+/CD38- recogidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y jeringa solo. Es posible una recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.
40

45 En una realización adicional en la que el perfundido de la PMPP más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional, tal como una aguja y una jeringa, da lugar a un enriquecimiento por 5 veces del porcentaje de células CD133+ obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y jeringa solo. Es posible una recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.
50

55 En aún otra realización adicional en la que el perfundido de la PMPP más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional, tal como una aguja y una jeringa, da lugar a una la población 7 veces mayor de células CD133+ obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y jeringa solo. Es posible una

recuperación total de células comparable si la placenta no se exanguinó antes de realizar el método de perfusión de la invención.

5 En otras realizaciones, las células madre del cordón umbilical pueden someterse a crioconservación.

10 En algunas realizaciones, la materia sujeto descrita incluye un método para tratar a un mamífero en necesidad de reconstitución hematopoyética que comprende (a) aislar células madre hematopoyéticas derivadas de la sangre del cordón placentario de acuerdo con un método descrito en el presente documento y (b) cultivar *in vitro* las células madre hematopoyéticas aisladas de acuerdo con un método descrito en el presente documento, produciendo de este modo células madre de la progenie. En ciertas realizaciones, estas células madre de la progenie se pueden utilizar inmediatamente o almacenar, por ejemplo, mediante crioconservación, para su uso futuro, tal como en una unidad para partos a un paciente en necesidad de las mismas. En realizaciones adicionales, el método puede comprender además (c) introducir en el mamífero una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre de la progenie, con lo que se efectúa la reconstitución hematopoyética. En algunas realizaciones, el mamífero se selecciona de entre un ser humano o un primate, por ejemplo, tal como un mandril u otro primate.

25 En otras realizaciones, la materia sujeto descrita incluye un método para tratar a un mamífero en necesidad de reconstitución hematopoyética que comprende (a) aislar células madre hematopoyéticas derivadas de la sangre del cordón placentario de acuerdo con un método descrito en el presente documento y (b) introducir en el mamífero una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre hematopoyéticas aisladas, con lo que se efectúa la reconstitución hematopoyética. En algunas realizaciones, el mamífero se selecciona de entre un ser humano o un primate, por ejemplo, tal como un mandril u otro primate.

30 En realizaciones adicionales, el método para tratar a un mamífero en necesidad de reconstitución hematopoyética puede comprender además crioconservar las células madre aisladas antes de que ellas, o sus células de la progenie derivadas, se introduzcan en un mamífero en necesidad del mismo. En realizaciones adicionales, las células aisladas madre, o sus células de la progenie derivadas, que se introducen en un mamífero en necesidad de los mismos pueden ser alogénicas, autólogas, o una combinación de las mismas, para el mamífero que recibe las células. En ciertas realizaciones, las células madre aisladas de más de una placenta se pueden agrupar juntas para su uso en el tratamiento de un mamífero en necesidad de las mismas. En realizaciones adicionales, la progenie derivada de las células madre aisladas de una placenta aislada puede agruparse junto con la progenie derivada de una o más placentas aisladas adicionales para su uso en el tratamiento de un mamífero en necesidad de la misma.

45 En algunas realizaciones, el método para tratar a un mamífero en necesidad de reconstitución hematopoyética implica un mamífero que tiene anemia aplásica, una neoplasia maligna hematopoyética, una enfermedad autoinmune, un trastorno genético, una inmunodeficiencia, un tumor sólido maligno, o una combinación de los mismos.

50 En ciertas realizaciones, el mamífero en necesidad de reconstitución hematopoyética tiene una neoplasia maligna hematopoyética seleccionada de leucemia, linfoma, mieloma

múltiple, síndrome mielodisplásico. En realizaciones adicionales, el mamífero en necesidad de reconstitución hematopoyética tiene una inmunodeficiencia resultante de la irradiación, la quimioterapia, la infección por un microorganismo patógeno, o una combinación de los mismos.

5

En una realización, la materia sujeto descrita incluye un método para la regeneración de tejido dañado en un mamífero en necesidad del mismo, que comprende: (a) cultivar *in vitro* las células madre de sangre de cordón aislado de acuerdo con la reivindicación 1, produciendo de este modo células diferenciadas o células madre expandidas; y (b) introducir en el mamífero por vía intravenosa o inyección directa en el órgano diana una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las células diferenciadas o células madre expandidas, mediante lo cual se efectúa la regeneración de tejidos. En una realización adicional se describe un método para la regeneración de tejido dañado en un mamífero en necesidad del mismo, que comprende introducir en el mamífero por vía intravenosa o inyección directa en el órgano diana una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre de sangre de cordón aislado de acuerdo con la reivindicación 1, con lo cual se efectúa la regeneración de tejidos.

10

15

20

En otras realizaciones se describe un método para la regeneración de tejido dañado en un mamífero en necesidad del mismo, en el que el tejido comprende una o más de tejido cardíaco, tejido muscular, tejido hepático, piel, tejido neural, tejido óseo, epitelios, estroma, o endotelio.

25

Breve descripción de las figuras

En la descripción detallada de la invención que se presenta a continuación, se hace referencia a los dibujos adjuntos en los que:

30

Figura 1. La máquina de perfusión placentaria pulsátil (PMPP) permite aumentar el recuento total de células mononucleares 1,5 veces por placenta (fracción de venopunción más fracción de PMPP) en comparación con la punción venosa sola. La figura representa un análisis de las 8 muestras de SC derivada de placenta obtenidas por el método de punción venosa (negro) seguido del método de la máquina de perfusión placentaria (patrón de rayas). Los números arábigos debajo de cada barra representan los números de las muestras que se muestran en la Tabla 1. (Figura 1). Los datos en bruto se presentan en la Tabla 3.

35

40

Figura 2. El porcentaje de la fracción de células CD34+ obtenidas mediante el método de PMPP contenía un porcentaje 4,9 veces mayor en comparación con la fracción obtenida mediante punción venosa.

45

Figura 3. Recuento de células CD34+ de la fracción obtenida mediante punción venosa y la fracción obtenida mediante PMPP fue $7,4 \times 10^6 \pm 5,9 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo de 8 pacientes, $1,1$ a $18,2 \times 10^6$) y $28,8 \times 10^6 \pm 37 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo de $1,6$ a 116×10^6), respectivamente, lo que indica que la fracción de PMPP contenía una cifra de células CD34+ totales 3,9 veces mayor.

50

Figura 4. El porcentaje medio de células CD34+/CD38- en las fracciones obtenidas mediante venopunción y mediante PMPP fue de $0,32 \pm 0,17\%$ (media \pm DE) (intervalo $0,04$ - $0,66$) y $4,4 \pm 4,1\%$ (media \pm DE) (intervalo $1,3$ a 14), respectivamente, lo que

demuestra que la fracción de PMPP contenía un aumento del porcentaje de la población de células CD34+/CD38- de 13-14 veces en comparación con la fracción de venopunción.

5 Figura 5. El número absoluto de células CD34+/CD38- en las fracciones obtenidas mediante punción venosa y mediante PMPP fue de $1,7 \pm 1,5 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo 0,12 a 5,2) y $17 \pm 22 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo 0,86 a 65), respectivamente (Figura 5), lo que indica que la fracción de PMPP contenía 10 veces más células CD34+/CD38-.

10 Figura 6. El porcentaje de células CD133+ en la fracción de punción venosa y de PMPP fue de $0,55 \pm 0,8\%$ (media \pm DE) (intervalo 0-2,5) y $2,4 \pm 2,0\%$ (media \pm DE) (intervalo 0,5 a 6,8), respectivamente, lo que demuestra un enriquecimiento del porcentaje de las células CD133+ 4 veces mayor en la fracción de PMPP.

15 Figura 7. El número de células CD133+ en la fracción obtenida por punción venosa y la fracción obtenida por PMPP fue $0,98 \pm 0,8 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo de 0 a 2,3) y $6,3 \pm 0,8 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo de 0,55 a 11,2), respectivamente. La población de células CD133+ en la fracción obtenida por PMPP se enriqueció de manera significativa a
20 un nivel de 6,3 veces mayor.

Figura 8A y 8B. La media del porcentaje y el número absoluto de células CD34+/CD38+ en las fracciones de venopunción y de PMPP fue de $1,34 \pm 0,6\%$ (media \pm DE) (intervalo de 0,26 a 2), $6,1 \pm 5,1 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo de 1,0 a 16,2), y $3,5 \pm 1,6\%$ (media \pm DE) (intervalo de 0,82 a 6), $11,9 \pm 15 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo de 0,78 a 50), respectivamente, lo que demuestra un incremento de 2,6 veces y 1,95 veces del porcentaje y el número absoluto de CD34+/CD38+, respectivamente, a favor de la PMPP.

Figura 9A y 9B. La media del porcentaje y el número absoluto de células CD133+/CD34- en las fracciones de venopunción y de máquina de perfusión placentaria pulsátil fue de $0,37 \pm 0,7\%$ (media \pm DE) (intervalo de 0 a 2), $0,36 \pm 0,7 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo de 0 a 1,9), y $1,16 \pm 1,5\%$ (media \pm DE) (intervalo de 0 a 5), $2,4 \pm 3,3 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo de 0 a 9,9), respectivamente, lo que indica que la fracción de PMPP contenía un enriquecimiento 3 veces mayor del número de células CD133+/CD34- y 6,6 veces mayor de CD133+/CD34-.

Figura 10A y 10B. La media del porcentaje y el número absoluto de células CD133+/CD34+ en las fracciones de venopunción y de máquina de perfusión placentaria pulsátil fue de $0,62 \pm 0,5\%$ (media \pm DE) (intervalo de 0 a 0,6), $0,68 \pm 0,6 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo de 0 a 1,89), y $1,26 \pm 0,8\%$ (media \pm DE) (intervalo de 0,35 a 2,9), $4,0 \pm 5,6 \times 10^6$ (media \pm DE) (intervalo de 0,35 a 16,5), respectivamente, lo que demuestra que la fracción de PMPP contenía un enriquecimiento 2 veces mayor del número de células CD133+/CD34+ y 5,9 veces mayor del número absoluto de células CD133+/CD34+.

45 **Descripción detallada de la invención**

En la siguiente descripción detallada, los métodos de la presente invención se pueden realizar en un número de diferentes variaciones y debe entenderse que se pueden usar otras realizaciones y se pueden realizar cambios lógicos sin apartarse del alcance de la presente invención. Por tanto, la siguiente descripción detallada no debe tomarse en un
50

sentido limitativo y el alcance de la presente invención viene definido por las reivindicaciones adjuntas.

5 Aunque a continuación se describen una serie de realizaciones discretas, debe entenderse que estos son ejemplos meramente no limitantes, y que cualquier realización dada de la invención puede comprender algunas de las características de una realización mostrada y/o algunas de las características de otra realización mostrada.

10 Se describe un método de recogida de células madre de sangre de cordón que puede comprender o consistir en perfusión, por ejemplo perfusión pulsátil, de una placenta de mamífero parcialmente exanguinada o no exanguinada aislada con una solución de perfusión para producir un líquido de perfusión que comprende células madre de sangre de cordón; recoger el líquido de perfusión que comprende las células madre de sangre de
15 producir células madre aisladas de sangre de cordón.

Además, se describe un método en el que el líquido de perfusión, por ejemplo, resultado de la perfusión pulsátil, más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional tiene como resultado un
20 aumento de al menos 1,5 veces en el recuento total de células mononucleares obtenidas de una placenta en comparación con la aspiración de la sangre del cordón umbilical de la vasculatura con una aguja y jeringa solo.

Se describe un método adicional, en el que el líquido de perfusión, por ejemplo, como resultado de la perfusión pulsátil, más de la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional da lugar a al
25 menos un aumento de 2 veces, de un aumento > 2 veces a un aumento de 10 veces, de un aumento de 4 veces a un aumento de 6 veces, o un aumento de 5,5 veces del porcentaje de células CD34+ obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del
30 cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y una jeringa solo.

Se describe un método en el que el líquido de perfusión, por ejemplo, resultado de la perfusión pulsátil, más aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional tiene como resultado un
35 aumento de 4,9 veces en el recuento total de células CD34+ obtenidas de una placenta en comparación con la aspiración de la sangre del cordón umbilical de la vasculatura con una aguja y jeringa solo.

Asimismo, se describe un método, en el que el líquido de perfusión, por ejemplo, como resultado de la perfusión pulsátil, más de la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional da lugar a al
40 menos un aumento de 5 veces, de un aumento > 5 veces a un aumento de 20 veces, de un aumento de 12 veces a un aumento de 18 veces, o un aumento de 14,8 veces del porcentaje de la población celular CD34+/CD38- obtenida en comparación con la
45 aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y una jeringa solo.

Se describe un método, en el que el líquido de perfusión, por ejemplo, como resultado de la perfusión pulsátil, más de la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional da lugar a una
50 recogida de al menos 5 veces más, de 5 veces a 20 veces más, de 10 veces a 15 veces

más u 11 veces más de células CD34+/CD38- en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y una jeringa solo.

5 Se describe un método adicional, en el que el líquido de perfusión, por ejemplo, como resultado de la perfusión pulsátil, más de la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional da lugar a al menos un aumento de 2 veces, un aumento de 2 veces a un aumento de 10 veces, de un aumento de 4 veces a un aumento de 8 veces o un aumento de 5 veces del porcentaje de células CD34+ enriquecidas obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y una jeringa solo.

15 Se describe un método adicional, en el que el líquido de perfusión, por ejemplo, como resultado de la perfusión pulsátil, más de la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con un método de exanguinación convencional da lugar a al menos un aumento de al menos 3 veces, de 3 veces a 15 veces, de 5 veces a 19 veces o de 7 veces mayor de la población de células CD133+ obtenidas en comparación con la aspiración de sangre del cordón umbilical de la vasculatura umbilical con una aguja y una jeringa solo.

20 I. Definiciones

Las definiciones siguientes son para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluido el alcance a dar a dichos términos.

25 Perfundir. El término "perfundir" o "perfusión" se refiere al acto de inducir un flujo de un fluido sobre o a través de una placenta no exanguinada o parcialmente exanguinada, preferiblemente el paso de fluido a través de una placenta no exanguinada o parcialmente exanguinada con suficiente fuerza o presión para eliminar las células residuales, por ejemplo, las células no unidas del órgano o tejido. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "líquido de perfusión" se refiere al fluido recogido después de su paso a través de un órgano o tejido. En una realización preferida, el líquido de perfusión contiene una o más anticoagulantes. Un flujo de solución de perfusión puede comprender un flujo mediado por presión de la solución de perfusión. Un flujo mediado por presión de la solución puede comprender un flujo de la solución mediado por presión positiva o negativa. Un flujo mediado por presión de la solución puede comprender un flujo pulsátil de la solución.

40 La perfusión puede comprender perfundir con al menos un primer volumen de la solución de perfusión durante un período de tiempo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1 hora; de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos; o de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 minutos.

45 La perfusión puede comprender perfundir una placenta no exanguinada o parcialmente exanguinada en un recipiente abierto o cerrado rígido o deformable. El recipiente puede comprender un volumen de la solución de perfusión de tal manera que la placenta no exanguinada o parcialmente exanguinada se sumerge en la solución de perfusión contenida en el recipiente durante la perfusión, con lo cual se combinan el volumen de la solución de perfusión y la solución de perfusión contenida en el recipiente se combinan antes de aislar las células madre de sangre de cordón. La placenta aislada sumergida y la solución de perfusión circundante pueden estar a presión ambiente o pueden estar sometidas a una presión positiva y/o negativa.

La perfusión puede comprender someter a una placenta no exanguinada o parcialmente exanguinada a un flujo pulsátil de la solución de perfusión utilizando una bomba peristáltica o pulsátil, por ejemplo, a de aproximadamente 15 a aproximadamente 90 latidos/min y a una presión sistólica de aproximadamente 15 a aproximadamente 90 mmHg; o a aproximadamente 60 latidos/min y a una presión sistólica de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 mmHg.

La fuente de presión usada para empujar o tirar de la solución de perfusión a través de la placenta de mamífero será suficiente para generar un flujo de la solución desde un sistema presurizado, por ejemplo, una bomba o dispositivo peristáltico o pulsátil. El uso de sistemas de bombeo peristáltico facilita la retención de la esterilidad en las soluciones cuyo flujo a través de la placenta se está induciendo. El nivel de presión real o la velocidad de bombeo se ajustan para optimizar la extracción de la sangre del cordón umbilical a partir de una placenta no exanguinada o parcialmente exanguinada.

Solución de perfusión. La expresión "solución de perfusión" significa cualquier solución o medio fisiológicamente compatible que comprende un anticoagulante suficiente para mantener la viabilidad de las células de sangre de cordón que comprende células madre. Las soluciones de perfusión adecuadas pueden comprender o consistir en un medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), que comprende opcionalmente gluconato y/o heparina, por ejemplo 1 000 U de heparina para un volumen total de 1 litro; y Belzer MPS que comprende opcionalmente heparina, por ejemplo heparina 2000U para un volumen total de 600-750 ml. Otras soluciones de perfusión adecuadas son conocidas y pueden seleccionarse y usarse fácilmente por un experto normal en la técnica. La perfusión puede comprender perfundir con al menos un primer volumen de la solución de perfusión. La perfusión se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 27°C, por ejemplo, a temperatura ambiente.

Primer volumen La expresión "primer volumen" significa un volumen de una solución de perfusión para la perfusión de una placenta de mamífero no exanguinada o parcialmente exanguinada. El primer volumen de la solución de perfusión puede comprender o consistir en aproximadamente 250 ml de la solución de perfusión a aproximadamente 2 litros, de aproximadamente 400 ml a aproximadamente 1,5 litros; de aproximadamente 500 ml a aproximadamente 1,2 litros, de aproximadamente 600 ml a aproximadamente 1 litro; y de aproximadamente 600 ml a aproximadamente 750 ml de la solución de perfusión.

Flujo mediado por presión. La expresión "flujo mediado por presión" significa un flujo de la solución de perfusión inducido por presión positiva o negativa.

Presión negativa. La expresión "presión negativa" significa una presión inferior a la presión atmosférica, es decir, menos de una atmósfera.

Presión positiva. La expresión "presión positiva" significa una presión de o por encima de una atmósfera, es decir, mayor que o igual a una atmósfera.

Placenta exanguinada. La expresión "placenta exanguinada" significa una placenta aislada de la que se ha eliminado o extraído toda la sangre que circula, es decir, para convertirla en sin sangre.

No exanguinada. La expresión "placenta no exanguinada" significa una placenta aislada de la que no se ha eliminado ni extraído la sangre circulante.

5 Parcialmente exanguinada. La expresión "placenta parcialmente exanguinada" significa una placenta aislada de la que se ha eliminado o extraído una parte de la sangre circulante.

10 Célula madre. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula madre" se refiere a una célula maestra que se puede reproducir indefinidamente para formar las células especializadas de los tejidos y órganos. Una célula madre es una célula pluripotencial o multipotencial en cuanto al desarrollo. Una célula madre se puede dividir para producir dos células madre hijas, o una célula madre hija y una célula progenitora ("de tránsito"), que luego prolifera en las células maduras, completamente formadas del tejido. La "célula madre" usada en el presente documento incluye "células progenitoras" a
15 menos que se indique lo contrario.

20 Las células madre hematopoyéticas son raros progenitores de células sanguíneas primitivas que tienen la capacidad de autorreplicarse, a fin de mantener una fuente continua de células regenerativas, y para diferenciarse, a fin de dar lugar a diversos precursores morfológicamente reconocibles de linajes de células sanguíneas. Estos precursores son células sanguíneas inmaduras que no se autorreplican y deben diferenciarse en células sanguíneas maduras, incluyendo las células eritroides, linfoides y mieloides. Dentro del microambiente de la médula ósea, las células madre autoproliferan y mantienen activamente la producción continua de todos los linajes de células
25 sanguíneas maduras durante toda la vida.

30 Las células CD34+ se definen como la célula madre hematopoyética más temprana identificable en la médula ósea, la sangre periférica o la sangre de cordón neonatal. El suplemento y el medio de la presente invención son particularmente adecuados para el apoyo a la expansión de las células CD34+ y las células de linaje mieloides, incluyendo células BFU-E, eritrocitos, células CFU-MEG, megacariocitos, células CFU-GM, monocitos, macrófagos, neutrófilos eosinófilos, y basófilos. En las etapas tempranas del desarrollo, las células de linaje mieloides expresan la proteína marcadora CD34+. En las
35 últimas etapas del desarrollo, las células de linaje mieloides no expresan niveles detectables de la proteína marcadora CD34+.

40 Un experto normal en la técnica puede determinar si una célula madre de sangre de cordón expresa la proteína marcadora CD34+ usando técnicas bien conocidas, tales como la clasificación de células activadas por fluorescencia.

45 Las células hematopoyéticas CD34+ o "células CD34+" son células hematopoyéticas que expresan la proteína marcadora de CD34+ en la superficie. Tales células incluyen, pero no se limitan a, células madre hematopoyéticas, células progenitoras o precursoras mieloides, células progenitoras o precursoras eritroides y células progenitoras o precursoras linfoides.

50 Las células CD3 + pueden aislarse de la sangre del cordón recogida y/o del líquido de perfusión para producir células madre de sangre de cordón aisladas utilizando métodos que son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Los expertos en la técnica disponen de varios sistemas. Por ejemplo, el Sistema MicroCELLector System.RTM. (Applied Immune Sciences), el sistema MiniMacs System (Miltenvi Biotec),

el sistema StemSep.TM. (StemCell Technologies) se pueden usar para aislar células CD34+. Para preparar una preparación de células enriquecidas en células CD34+ a escala mayor, los sistemas comercializados por Baxter Healthcare y CellPro están disponibles para los expertos normales en la técnica.

5

Las expresiones "células madre hematopoyéticas" y "células madre hematopoyéticas pluripotenciales" se refieren a una célula que puede dar lugar a cualquier tipo de célula progenitora o precursora hematopoyética, incluyendo células progenitoras o precursoras mieloides, células progenitoras o precursoras eritroides y células progenitoras o precursoras linfoides. Las células madre hematopoyéticas muestran un fenotipo CD34+ /CD33- /CD38- o un fenotipo CD34+ /HLD-DR.- /CD38-(Daley, J. P. *et al.*, Focus 18:62-67 (1996); Pimentel, E., Ed., Handbook of Growth Factors Vol. 111: Hematopoietic Growth Factors and Cytokines, pp. 1-2, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1994).

10

15 1. Método de recolección de células de SC de placenta con o sin recolección de SC

Una prueba piloto de prueba de concepto para la recogida de SC usando una tecnología de perfusión pulsátil utilizando el dispositivo de perfusión pulsátil RM3 de Waters (Waters Medica! Systems, Rochester, MN), utilizada ampliamente para la conservación renal, tuvo éxito. El dispositivo se diseñó originalmente para mejorar la función inmediata de los riñones que se almacenan antes del trasplante. La solución de perfusión consistió en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) con gluconato y heparina 1000 U de heparina para un total de 1 litro o medio Belzer MPS más 1000-2000 U de heparina (600-750 ml de Belzer MPS con 2000 U de heparina sódica). En la actualidad, se ha demostrado con placenta de babuino, la viabilidad de este método y de la perfusión con éxito y la ex1racción de la SC restante de la totalidad de la placenta. La obtención de un recuento absoluto de células mononucleares totales, recuento células formadoras de colonias (CFC) y porcentaje y recuento de CD34+ y de CD34+/CD38- fue aproximadamente 2 veces mayor cuando se añadió la máquina de perfusión al método de punción venosa convencional en comparación con el método de la punción venosa solo.

20

25

30

Sobre la base de la prometedora obtención de SC de babuino mediante la máquina de perfusión pulsátil, este método se probó en placentas humanas. Se realizaron ocho extracciones de SC en placentas de 36-41 semanas de 7 partos vaginales normales y una cesárea conforme al protocolo clínico aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Maryland. La obtención parcial de SC s realizó primero por punción venosa con aguja/jeringa para aspirar la máxima cantidad posible tan pronto como el cordón umbilical se punzó y el bebé nació, mientras la placenta aún estaba en el útero. Este método se utiliza tanto para partos transvaginales como por cesárea para maximizar el rendimiento de la recogida de SC y es uno de los varios métodos utilizados ampliamente para la obtención de SC de rutina. La aguja de calibre 18 se acopló a jeringas de 30 o 60 ml y el material de se aspirado se transfirió inmediatamente a un tubo cónico de 50 ml que contiene 5000 U de solución de heparina. La SC recogida se mezcló inmediatamente con heparina para prevenir la coagulación y almacenarla en una nevera portátil. El volumen medio de la SC recogida por este procedimiento fue de 59 ± 18 ml (media \pm DE) (intervalo 40-90 ml). A continuación, la placenta se ex1rajo de la forma normal y se colocó directamente en una bolsa de aislamiento estéril (3M Health Care St. Paul, MN). Si la placenta requirió un examen visual, se colocó en una bandeja estéril y se transfirió a una bolsa de aislamiento estéril en el momento de la finalización de la exploración. La placenta se pesó dentro de la bolsa estéril también. La bolsa estéril se

35

40

45

50

cerró herméticamente y se colocó en la bolsa de aislamiento triple y se mantuvo en una nevera portátil sin ningún tipo de manipulación hasta que se inició la perfusión de la placenta. Las placentas se perfundieron entre 6,25 y 39 horas después del parto. Una placenta se pueden enfriar después del aislamiento a una temperatura de aproximadamente -3°C a aproximadamente 15°C, de aproximadamente -8°C a aproximadamente 10°C, de aproximadamente -2°C a aproximadamente 6°C, o de aproximadamente 0°C a aproximadamente 6°C, siempre que no se permita la congelación de la placenta. La placenta enfriada puede mantenerse antes de la perfusión a una temperatura por encima de la de congelación, por ejemplo, a de aproximadamente > 0°C a aproximadamente 15°C. a aproximadamente > 0°C a aproximadamente 10°C, o a aproximadamente 2°C a aproximadamente 6°C, durante un período de tiempo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 50 horas; de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 40 horas; de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 40 horas; de aproximadamente 15 horas a aproximadamente 40 horas; o de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 40 horas.

Para llevar una perfusión placentaria pulsátil en máquina (PMPP), la placenta se colocó en un campo estéril y se examinó para determinar si había alguna laceración o desgarro en la placenta. A continuación, el cordón umbilical se examinó para buscar 2 arterias umbilicales y 1 vena del cordón umbilical. Una o más de las dos arterias umbilicales y la vena umbilical se canularon para facilitar la perfusión. En primer lugar, se insertó una cánula recta de 6 mm en una vena del cordón umbilical y se ató en su lugar con el hilo de seda o, después, ambas arterias se insertaron cada una con cánulas rectas de 2 mm y se colocaron en su lugar con hilos de seda o. La placenta se colocó en el circuito de perfusión (bomba de perfusión renal Waters RM3), que se cebó con medio Belzer MPS plus 1000-2000 U de heparina (600-750 ml de Belzer MPS con 2000 U heparina sódica) a una temperatura de 1°C a 27°C. El medio Belzer MPS es un líquido de perfusión de órganos aprobado por la FDA usado para la conservación de órganos donados para trasplante de cadáver (Gage *et al.*, 1997). La perfusión pulsátil en máquina se realizó a 60 latidos/min y la presión sistólica estaba en entre 30-70 mmHg. El tiempo medio para completar la perfusión fue de 26 minutos (intervalo 20-30 min). Para determinar la finalización de la perfusión placentaria se utilizó el cambio de color del tejido de la placenta desde un color azul oscuro a un color blanco claro como marcador de la evacuación total del contenido vascular en la placenta.

Se recogieron ocho muestras de SC mediante punción venosa y el método de la máquina de perfusión placentaria del mismo sujeto y sus descripciones cuantitativas se resumen en la Tabla I. El volumen medio de la se recogida por punción venosa fue como se ha descrito anteriormente. El volumen de la SC obtenida mediante el método placenta máquina de perfusión pulsátil no se pudo medir, ya que el líquido de perfusión y la SC se mezclaron en el extremo. La gestación media de la placenta recogida fue de 38,6 semanas (intervalo de 36-41 semanas) y el tamaño medio de la placenta para el diámetro y el espesor fue de 20 x 1 cm (17 a 22 x 1 cm). Las placentas se obtuvieron de una cesárea (muestra 1) y 7 partos vaginales (muestra 2-8). El tiempo medio desde el parto de la placenta al inicio de la perfusión fue de 17 horas (media) (6,25-39 horas), y el tiempo de duración del procedimiento de perfusión de la placenta fue de menos de 30 min por placenta (media de 26 minutos, intervalo 20-30 min) (Tabla I). Se encontró trombosis en 3 placentas (muestras 3, 5, y 6) y fue de aproximadamente 5%, 10% y 7% de la superficie total de la placenta, pero no se vio en otros sujetos. Estas placentas se introdujeron en hielo a una temperatura de 4°C en un cofre aislado térmicamente entre 19

y 39 horas hasta el inicio de la perfusión. En general, no hubo dificultades en la realización de perfusión en máquina para cada placenta que se analizó, incluyendo aquellas con trombosis, y no se observó barotrauma causado por la máquina de perfusión pulsátil.

5

Tabla I. Características de las extracciones de sangre del cordón umbilical de 8 placentas

Nº de muestra	Gestación (semana)	Tamaño de la placenta (diámetro x espesor cm)	Tiempo hasta la perfusión (h)	Tiempo de perfusión (h)	Volumen de SC con jeringa (ml)	Método de parto	Coágulo de sangre en la placenta (%)
1	39	18 x 1	9,5	0,5	50	cesárea	0
2	39	19 x 1	7	0,5	80	vaginal	0
3	39	22 x 1	27	0,42	65	vaginal	5
4	40	21 x 1	15	0,37	62	vaginal	0
5	36	18 x 1	39	0,33	40	vaginal	10
6	40	25 x 1	19	0,42	90	vaginal	7
7	36	17 x 1	6,25	0,33	46	vaginal	0
8	40	21 x 1	12,5	0,6	40	vaginal	0

10 2. Análisis de la solución obtenida de PMPP en comparación con el método de obtención de sangre de cordón convencional

Aislamiento de células mononucleares de SC

15 Las células de SC obtenidas por punción venosa de la vasculatura de la placenta se diluyeron primero con medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) a 1:5 y las células mononucleares se aislaron por Ficoll-Hypaque (Sigma Diagnostic, St Louis, MO) centrifugación por gradiente de densidad como se ha descrito previamente (Takebe *et al.*, 2002). La capa que contiene las células mononucleares se aspiró suavemente, las
20 células se lavaron dos veces con solución PBS y se contaron mediante citómetro. La viabilidad celular se confirmó por el método de exclusión con azul tripán. Las células de SC obtenidas a través de PMPP se procesaron de manera similar a las células de SC obtenidas mediante punción venosa. Sin embargo, estas células se mezclaron en un gran volumen de líquido de perfusión (650 a 800 ml de volumen total). Este líquido de
25 perfusión se dividió en alícuotas entre varias docenas o similar de tubos cónicos de 50 ml de modo que se centrifugaron juntos a 1800 rpm durante 20 minutos para obtener la capa de la capa leucocitaria. Después, las células se separaron aún más para las células mononucleares con centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. Las células de SC se lavaron y se contaron tal como se ha descrito anteriormente.

30

Análisis por citometría de flujo

Las células mononucleares se tificaron con anticuerpos monoclonales, incluyendo CD38-FITC, CD34-APC (BD Pharmingen, San Jose, CA), AC133-PE (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) anti-humanos y se analizaron mediante Facstar-plus (Becton Dickinson) según las
35 instrucciones del fabricante. Los controles de isotipo se realizaron con anticuerpos apropiados en paralelo para cada muestra.

40

Selección de células CD34+

5 Las alícuotas de las células mononucleares de SC obtenidas mediante centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque se aislaron adicionalmente para enriquecer la población de células CD34+ mediante el método de separación celular magnética usando el kit de aislamiento de células progenitoras CD34 (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. El número de células purificadas y la viabilidad se determinaron mediante citómetro y prueba de exclusión con azul tripán. El enriquecimiento para las células CD34+ se confirmó por análisis de citometría de flujo, y cada lote aislado mostró más de un 90% de pureza de células CD34+ con una viabilidad superior al 95% por el método de exclusión con azul tripán.

Ensayos de unidad formadora de colonias con metilcelulosa

15 Las células de SC CD34+ purificadas (3×10^3 por placa) se sembraron en placas de cultivo de 35 mm como se ha descrito previamente. Las células se cultivaron en el medio de cultivo disponible comercialmente, MethoCult (StemCell Technology, Vancouver, Canadá), compuesto por 1 ml de IMDM, 1% de metilcelulosa, BSA, 2-mercaptoetanol, L-glutamina, insulina, transferrina, SCF, GM-CSF, IL -3, IL-6, G-CSF, eritropoyetina según las instrucciones del fabricante. El día 14, las colonias (mayores de 50 células) se enumeraron a partir de las placas de cultivo duplicadas.

Tabla II. Resumen de las unidades formadoras de colonias de 3 muestras de SC que contienen una muestra de par apareada del método de punción venosa y el método de la máquina de perfusión placentaria

Número de muestra	CFU-GM (a)		CFU-GEMM (b)		BFU-E	
	*VP	**PL	VP	PL	VP	PL
1	366 ± 59	110 ± 42	2 ± 0,7	6 ± 0,7	1 ± 0	0
2	608 ± 36	197 ± 36	4 ± 0,7	12 ± 1,4	0	7 ± 0,7
3	650 ± 173	243 ± 40	1 ± 1,4	9 ± 3	0	3 ± 1,4

CFU-GM: Unidad formadora de colonias de macrófagos- granulocitos
 CFU-GEMM: Unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos
 BFU-E: Unidad formadora de descarga -eritroide
 a y b: La prueba t pareada mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la punción venosa y la máquina de perfusión placentaria.
 *VP: método de punción venosa
 **PL: método de PMPP

25

Tabla III. Características fenotípicas de las células madre de SC recogidas mediante punción venosa o método PMPP

N.º de paciente	VP* TMNC***	PL** TMNC	VP CD34+	PL CD34+	VP CD34+38-	PL CD34+38-	VP CD34+38+	PL CD34+38+
Paciente 1	50 x 10 ⁶	63 x 10 ⁶	1,1 ^a (2,2) ^b	2,7 ^a (4,4) ^b	0,12 ^a (0,2) ^b	0,92 ^a (1,5) ^b	1,0 ^a (2) ^b	1,9 ^a (3) ^b
Paciente 2	200 x 10 ⁶	72 x 10 ⁶	4,9 (2,5)	6,3 (8)	0,66 (0,3)	1,98 (2,8)	3,1 (1,5)	4,3 (6)
Paciente 3	770 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶	15 (2)	56,8 (18)	2,7 (0,35)	42 (14)	16,2 (2)	16,6 (5,5)
Paciente 4	840 x 10 ⁶	100 x 10 ⁶	1,76 (0,2)	2,25 (2,25)	1,6 (0,19)	1,43 (1,43)	2,18 (.26)	0,82 (0,82)
Paciente 5	115 x 10 ⁶	1290 x 10 ⁶	2,4 (2)	116 (9)	0,44 (0,4)	65 (5,1)	1,9 (1,7)	50 (3,9)
Paciente 6	520 x 10 ⁶	260 x 10 ⁶	8,3 (1,6)	28,6 (11)	2,4 (0,46)	19,2 (7,4)	5,9 (1,14)	9,5 (3,65)
Paciente 7	790 x 10 ⁶	47 x 10 ⁶	18,2 (2,23)	1,6 (3,45)	5,2 (0,66)	0,86 (1,82)	12,4 (1,57)	0,78 (1,65)
Paciente 8	1260 x 10 ⁶	330 x 10 ⁶	6,99 (0,55)	16,1 (4,9)	0,5 (0,04)	4,29 (1,3)	6,43 (0,51)	11,2 (3,38)

*VP: método de punción venosa
**PL: método de PMPP
***TMNC: Células mononucleares totales
a: x 10⁶
b: Porcentaje de células mononucleares totales

Tabla IV. Características fenotípicas de las células madre de SC recogidas mediante punción venosa o método PMPP

N.º de paciente	VP* CD133+	PL** CD133+	VP CD133+34+	PL CD133+34+	VP CD133+38-	PL CD133+38-	VP CD133+34-	PL CD133+34-
Paciente 1	1,3 ^a (1,0) ^b	1,4 ^a (2,3) ^b	0,32 ^a (0,6) ^b	.0,84 ^a (1,3) ^b	0,08 ^a (.15) ^b	0,61 ^a (.97) ^b	1 ^a (2) ^b	0,6 ^a (0,96) ^b
Paciente 2	2,3 (2,5)	4,9 (6,8)	0,6 (0,3)	1,3 (1,8)	1,1 (0,57)	4,1 (5,6)	1,9 (0,97)	3,6 (5)
Paciente 3	0,46 (.06)	3,8 (1,2)	0,54 (.07)	3,7 (1,2)	0 (0)	3,7 (1,25)	0 (0)	0 (0)
Paciente 4	0 (0)	0,8 (0,8)	0 (0)	0,35 (0,35)	0 (0)	0,88 (.88)	0 (0)	0,43 (.43)
Paciente 5	0,43 (.37)	26 (2,1)	0,6 (0,53)	16,5 (1,3)	0 (0)	27 (2,1)	0 (0)	9,9 (0,77)
Paciente 6	9,8 (0,35)		1,5 (0,29)		0,4 (0,08)	9,5 (3,65)	0 (0)	4,4 (1,7)
Paciente 7	0 (0)	0,55 (1,18)	0 (0)	0,35 (0,74)	0 (0)	0,49 (1,04)	0 (0)	0,21 (0,44)
Paciente 8	1,51 (0,12)	1,65 (0,5)	1,89 (0,15)	1,68 (0,51)	0 (0)	2,54 (0,77)	0 (0)	0,03 (0,01)

*VP: método de punción venosa
**PL: método de PMPP
**TMNC: Células mononucleares totales
a: x 10⁶
b: Porcentaje de células mononucleares totales

Referencias

Las siguientes referencias se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

- 5
- ALMEIDA-PORADA, G., PORADA, C.D., CHAMBERLAIN, J., TORABI, A., and ZANJANI, E.D. (2004). Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood* 104, 2582-2590.
- 10
- AZIZI, S.A., STOKES, D., AUGELLI, B.J., DIGIROLAMO, C., and PROCKOP, D.J. (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3908-3913.
- 15
- BARKER, J.N., KREPSKI, T.P., DEFOR, T.E., DAVIES, S.M., WAGNER, J.E., and WEISDORF, D.J. (2002). Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant* 8, 257-260.
- 20
- BELVEDERE, O., FERUGLIO, C., MALANGONE, W., BONORA, M.L., MINISINI, A.M., SPIZZO, R., DONINI, A., SALA, P., DE ANNA, D., HILBERT, D.M., and DEGRASSI, A. (2000). Increased blood volume and CD34(+)CD38(-) progenitor cell recovery using a novel umbilical cord blood collection system. *Stem Cells* 18, 245-251.
- 25
- BERTOLINI, F., LAZZARI, L., LAURI, E., CORSINI, C., CASTELLI, C., GORINI, F., and SIRCHIA, G. (1995). Comparative study of different procedures for the collection and banking of umbilical cord blood. *J Hematother* 4, 29-36.
- 30
- BHATTACHARYA, S., JACKSON, J.D., DAS, A.V., THORESON, W.B., KUSZYNSKI, C., JAMES, J., JOSHI, S., and AHMAD, I. (2003). Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 2764-2773.
- 35
- BICKNESE, A.R., GOODWIN, H.S., QUINN, C.O., HENDERSON, V.C., CHIEN, S.N., and WALL, D.A. (2002). Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. *Cell Transplant* 11, 261-264.
- 40
- BRAZEL TON, T.R., ROSSI, F.M., KESHET, G.I., and BLAU, H.M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-1779.
- 45
- CAI, J., CHENG, A., LUO, Y., LU, C., MATTSON, M.P., RAO, M.S., and FURUKAWA, K. (2004a). Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem* 88, 212-226.
- 50
- CAI, J., WEISS, M.L., and RAO, M.S. (2004b). In search of "stemness". *Exp Hematol* 32, 585-598.
- CAI, J., WU, Y., MIRUA, T., PIERCE, J.L., LUCERO, M.T., ALBERTINE, K.H., SPANGRUDE, G.J., and RAO, M.S. (2002). Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Dev Biol* 251, 221-240.

- CAMARGO, F.D., FINEGOLD, M., and GOODELL, M.A. (2004). Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest* 113, 1266-1270.
- 5 CHEN, N., HUDSON, J.E., WALCZAK, P., MISIUTA, I., GARBUZOVA-DAVIS, S., JIANG, L., SANCHEZ-RAMOS, J., SANBERG, P.R., ZIGOVA, T., and WILLING, A.E. (2005). Human Umbilical Cord Blood Progenitors: The Potential of These Hematopoietic Cells to Become Neural. *Stem cells* (Dayton, Ohio).
- 10 COGLE, C.R., YACHNIS, A.T., LAYWELL, E.D., ZANDER, D.S., WINGARD, J.R., STEINDLER, D.A., and SCOTT, E.W. (2004). Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 363, 1432-1437.
- 15 CORTI, S., LOCATELLI, F., PAPADIMITRIOU, D., DONADONI, C., DEL BO, R., CRIMI, M., BORDONI, A., FORTUNATO, F., STRAZZER, S., MENOZZI, G., SALANI, S., BRESOLIN, N., and COMI, G.P. (2006). Transplanted ALDHhiSSC^{lo} neural stem cells generate motor neurons and delay disease progression of nmd mice, an animal model of SMARD1. *Hum Mol Genet* 15, 167-187.
- 20 DONALDSON, C., ARMITAGE, W.J., LAUNDY, V., BARRON, C., BUCHANAN, R., WEBSTER, J., BRADLEY, B., and HOWS, J. (1999). Impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. *British journal of haematology* 106.128-132.
- 25 EGLITIS, M.A., and MEZEY, E. (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 408D-4085.
- 30 ESCOLAR, M.L., POE, M.D., PROVENZALE, J.M., RICHARDS, K.C., ALLISON, J., WOOD, S., WENGER, D.A., PIETRYGA, D., WALL, D., CHAMPAGNE, M., MORSE, R., KRIVIT, W., and KURTZBERG, J. (2005). Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *N Engl J Med* 352, 2069-2081. FERRARI, G., CUSELLA-DE ANGELIS, G., COLETTA, M., PAOLUCCI, E., STORNAIUOLO, A., COSSU, G., and MAVILIO, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.
- 35 FORRAZ, N., PETTENGELL, R., and MCGUCKIN, C.P. (2004). Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for *ex vivo* expansion and enriched for L TC-IC. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 22, 100-108.
- 40 FORTUNEL, N.O., OTU, H.H., NG, H.H., CHEN, J., MU, X., CHEVASSUT, T., LI, X., JOSEPH, M., BAILEY, C., HATZFELD, J.A., HATZFELD, A., USTA, F., VEGA, V.B., LONG, P.M., LIBERMANN, T.A., and LIM, B. (2003). Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". *Science* 302, 393; author reply 393.
- 45 GAGE, F., BARHYTE, D.Y., KOWALSKI, A.E., LIGHT, J.A., WILMER, R., and CALLENDER, C.O. (1997). A comparison study of the Belzer machine preservation solution with and without penicillin. *Transplant Proc* 29, 3643.
- 50 GEKAS, C., DIETERLEN-LIEVRE, F., ORKIN, S.H., and MIKKOLA, H.K. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 8, 365-375.

GEORGE, T.J., SUGRUE, M.W., GEORGE, S.N., and WINGARD, J.R. (2006). Factors associated with parameters of engraftment potential of umbilical cord blood. *Transfusion* 46, 1803-1812.

5

GLUCKMAN, E., ROCHA, V., BOYER-CHAMMARD, A., LOCATELLI, F., ARCESE, W., PASQUINI, R., ORTEGA, J., SOUILLET, G., FERREIRA, E., LAPORTE, J.P., FERNANDEZ, M., and CHASTANG, C. (1997). Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 337, 373-381.

10

GOODWIN, H.S., BICKNESE, A.R., CHIEN, S.N., BOGUCKI, B.O., QUINN, C.O., and WALL, D.A. (2001). Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 7, 581-588.

15

HARRIS, D.T., SCHUMACHER, M.J., RYCHLIK, S., BOOTH, A., ACEVEDO, A., RUBINSTEIN, P., BARD, J., and BOYSE, E.A. (1994). Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone marrow transplantation* 13, 135-143.

20

HRUBAN, R.H., LONG, P.P., PERLMAN, E.J., HUTCHINS, G.M., BAUMGARTNER, W.A., BAUGHMAN, K.L., and GRIFFIN, C.A. (1993). Fluorescence in situ hybridization for the Y-chromosome can be used to detect cells of recipient origin in allografted hearts following cardiac transplantation. *Am J Pathol* 142, 975-980.

25

KIM, M., TURNQUIST, H., JACKSON, J., SGAGIAS, M., YAN, Y., GONG, M., DEAN, M., SHARP, J.G., and COWAN, K. (2002). The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res* 8, 22-28.

30

KORBLING, M., KATZ, R.L., KHANNA, A., RUIFROK, A.C., RONDON, G., ALBITAR, M., CHAMPLIN, R.E., and ESTROV, Z. (2002). Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 346, 738-746.

35

KUCI, S., WESSELS, J.T., BUHRING, H.J., SCHILBACH, K., SCHUMM, M., SEITZ, G., LOFFLER, J., BADER, P., SCHLEGEL, P.G., NIETHAMMER, D., and HANDGRETINGER, R. (2003). Identification of a novel class of human adherent CD34-stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood* 101, 869-876.

40

KUCIA, M., HALASA, M., WYSOCZYNSKI, M., BASKIEWICZ-MASIUK, M., MOLDENHAWER, S., ZUBA-SURMA, E., CZAJKA, R., WOJAKOWSKI, W., MACHALINSKI, B., and RATAJCZAK, M.Z. (2006). Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4(+) SSEA-4(+) Oct-4(+) very small embryonic-like cells purified from human cord blood -preliminary report. *Leukemia*.

45

KURTZBERG, J., LAUGHLIN, M., GRAHAM, M.L., SMITH, C., OLSON, J.F., HALPERIN, E.C., CIOCCI, G., CARRIER, C., STEVENS, C.E., and RUBINSTEIN, P. (1996). Placenta! blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 335, 157-166.

50

- LAGASSE, E., CONNORS, H., AL-DHALIMY, M., REITSMA, M., DOHSE, M., OSBORNE, L., WANG, X., FINEGOLD, M., WEISSMAN, I.L., and GROMPE, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 6, 1229-1234.
- 5 LASKY, L.C., LANE, T.A., MILLER, J.P., LINDGREN, B., PATTERSON, H.A., HALEY, N.R., and SALLEN, K. (2002). In utero or ex utero cord blood collection: which is better? *Transfusion* 42, 1261-1267.
- 10 LAUGHLIN, M.J., EAPEN, M., RUBINSTEIN, P., WAGNER, J.E., ZHANG, M.J., CHAMPLIN, R.E., STEVENS, C., BARKER, J.N., GALE, R.P., LAZARUS, H.M., MARKS, O.1., VAN ROOD, J.J., SCARADAVOU, A., and HOROWITZ, M.M. (2004). Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 351, 2265-2275.
- 15 LEESER, D.B., BINGAMAN, A.W., POLIAKOVA, L., SHI, Q., GAGE, F., BARTLETT, S.T., and FARNEY, A.C. (2004). Pulsatile pump perfusion of pancreata before human islet cell isolation. *Transplant Proc* 36, 1050-1051.
- 20 MCGUCKIN, C.P., FORRAZ, N., ALLOUARD, Q., and PETTENGELL, R. (2004). Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors *in vitro*. *Exp Cell Res* 295, 350-359.
- 25 MCGUCKIN, C.P., FORRAZ, N., BARADEZ, M.O., NAVRAN, S., ZHAO, J., URBAN, R., TILTON, R., and DENNER, L. (2005). Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif* 38, 245-255.
- 30 MEZEY, E., CHANDROSS, K.J., HARTA, G., MAKI, R.A., and MCKERCHER, S.R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782.
- 35 MIGISHIMA, F., OIKAWA, A., KONDO, S., EMA, H., MORITA, Y., NAKAUCHI, H., YOKOYAMA, M., SONG, S.Y., NISHIJIMA, M., OKABE, M., and SHINOHARA, N. (2003). Full reconstitution of hematopoietic system by murine umbilical cord blood. *Transplantation* 75, 1820-1826.
- 40 MULLER, P., PFEIFFER, P., KOGLIN, J., SCHAFERS, H.J., SEELAND, U., JANZEN, I., URBSCHAT, S., and BOHM, M. (2002). Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation* 106, 31-35.
- 45 OKAMOTO, R., YAJIMA, T., YAMAZAKI, M., KANAI, T., MUKAI, M., OKAMOTO, S., IKEDA, Y., HIBI, T., INAZAWA, J., and WATANABE, M. (2002). Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 8, 1011-1017.
- 50 OTTERSBAACH, K., and DZIERZAK, E. (2005). The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 8, 377-387.
- PARMAR, K., SAUK-SCHUBERT, C., BURDICK, D., HANDLEY, M., and MAUCH, P. (2003). Sca+CD34- murine side population cells are highly enriched for primitive stem cells. *Exp Hematol* 31, 244-250.

- PETERSEN, B.E., BOWEN, W.C., PATRENE, K.O., MARS, W.M., SULLIVAN, A.K., MURASE, N., BOGGS, S.S., GREENBERGER, J.S., and GOFF, J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
- 5 QUAINI, F., URBANEK, K., BELTRAMI, A.P., FINATO, N., BELTRAMI, C.A., NADALGINARD, B., KAJSTURA, J., LERI, A., and ANVERSA, P. (2002). Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346, 5-15.
- 10 RUBINSTEIN, P., CARRIER, C., SCARADAVOU, A., KURTZBERG, J., ADAMSON, J., MIGLIACCIO, A.R., BERKOWITZ, R.L., CABBAD, M., DOBRILA, N.L., TAYLOR, P.E., ROSENFELD, R.E., and STEVENS, C.E. (1998). Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 339, 1565-1577.
- 15 RUBINSTEIN, P., ROSENFELD, R.E., ADAMSON, J.W., and STEVENS, C.E. (1993). Stored placenta! blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 81, 1679-1690.
- 20 SANCHEZ-RAMOS, J., SONG, S., CARDOZO-PELAEZ, F., HAZZI, C., STEDEFORD, T., WILLING, A., FREEMAN, T.B., SAPORTA, S., JANSSEN, W., PATEL, N., COOPER, D.R., and SANBERG, P.R. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 164, 247-256.
- SANCHEZ-RAMOS, J.R. (2002). Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 69, 880-893.
- 25 SANCHEZ-RAMOS, J.R., SONG, S., KAMATH, S.G., ZIGOVA, T., WILLING, A., CARDOZO-PELAEZ, F., STEDEFORD, T., CHOPP, M., and SANBERG, P.R. (2001). Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 171, 109-115.
- 30 SCHARENBERG, C.W., HARKEY, M.A., and TOROK-STORB, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99, 507-512.
- 35 SHLEBAK, A.A., ROBERTS, I.A., STEVENS, T.A., SYZDLO, R.M., GOLDMAN, J.M., and GORDON, M.Y. (1998). The impact of antenatal and perinatal variables on cord blood haemopoietic stem/progenitor cell yield available for transplantation. *Br J Haematol* 103, 1167-1171.
- 40 STORMS, R.W., TRUJILLO, A.P., SPRINGER, J.B., SHAH, L., COLVIN, O.M., LUDEMAN, S.M., and SMITH, C. (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9118-9123.
- 45 TAKEBE, N., XU, L.C., MACKENZIE, K.L., BERTINO, J.R., and MOORE, M.A. (2002). Methotrexate selection of long-term culture initiating cells following transduction of CD34(+) cells with a retrovirus containing a mutated human dihydrofolate reductase gene. *Cancer Gene Ther* 9, 308-320.
- 50 TAKEBE, N., ZHAO, S.C., ADHIKARI, D., MINEISHI, S., SADELAIN, M., HILTON, J., COLVIN, M., BANERJEE, D., and BERTINO, J.R. (2001). Generation of dual resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide and methotrexate by retroviral transfer of the human

aldehyde dehydrogenase class 1 gene and a mutated dihydrofolate reductase gene. *Mol Ther* 3, 88-96.

5 THEISE, N.O., NIMMAKAYALU, M., GARDNER, R., ILLEI, P.B., MORGAN, G.,
TEPERMAN, L., HENEGARIU, O., and KRAUSE, D.S. (2000). Liver from bone marrow in
humans. *Hepatology* 32, 11-16.

10 TURNER, C.W., LUZINS, J., and HUTCHESON, C. (1992). A modified harvest technique
for cord blood hematopoietic stem cells. *Bone marrow transplantation* 10, 89-91.

15 WAGNER, J.E., BARKER, J.N., DEFOR, T.E., BAKER, K.S., BLAZAR, B.R., EIDE, C.,
GOLDMAN, A., KERSEY, J., KRIVIT, W., MACMILLAN, M.L., ORCHARD, P.J., PETERS,
C., WEISDORF, D.J., RAMSAY, N.K., and DAVIES, S.M. (2002). Transplantation of
unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant
diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality
and survival. *Blood* 100, 1611-1618.

20 WAGNER, J.E., BROXMEYER, H.E., and COOPER, S. (1992). Umbilical cord and
placenta! blood hematopoietic stem cells: collection, cryopreservation, and storage. *J
Hematother* 1, 167-173.

25 WAGNER, J.E., ROSENTHAL, J., SWEETMAN, R., SHU, X.O., DAVIES, S.M., RAMSAY,
N.K., MCGLAVE, P.B., SENDER, L., and CAIRO, M.S. (1996). Successful transplantation
of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors:
analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 88, 795-802.

30 WANG, X., GE, S., MCNAMARA, G., HAO, Q.L., CROOKS, G.M., and NOL TA, J.A.
(2003a). Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-
deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells.
Blood 101, 4201-4208.

35 WANG, X., WILLENBRING, H., AKKARI, Y., TORIMARU, Y., FOSTER, M., AL-DHALIMY,
M., LAGASSE, E., FINEGOLD, M., OLSON, S., and GROMPE, M. (2003b). Cell fusion is
the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422, 897-901.

40 ZHOU, S., SCHUETZ, J.D., BUNTING, K.O., COLAPIETRO, A.M., SAMPATH, J.,
MORRIS, J.J., LAGUTINA, I., GROSVELD, G.C., OSAWA, M., NAKAUCHI, H., and
SORRENTINO, B.P. (2001). The ABC transporter *Bcrp1/ABCG2* is expressed in a wide
variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat
Med* 7, 1028-1034.

45 ZIGOVA, T., SONG, S., WILLING, A.E., HUDSON, J.E., NEWMAN, M.B., SAPORTA, S.,
SANCHEZ-RAMOS, J., and SANBERG, P.R. (2002). Human umbilical cord blood cells
express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant*
11, 265-274.

50 Habiendo descrito la invención con detalle y por referencia a las realizaciones de la
misma, será evidente que se pueden realizar modificaciones y variaciones, incluyendo la
adición de elementos o el reordenamiento o combinación o uno o más elementos, sin
apartarse del alcance de la invención que se define en las reivindicaciones adjuntas. Por
tanto, la presente invención no está destinada a limitarse a las realizaciones mostradas

en el presente documento sino que debe concedérsele el alcance más amplio consistente con los principios y características novedosas divulgadas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un método de recoger células madre hematopoyéticas de sangre de cordón, que comprende:
- 5
- proporcionar una placenta de mamífero no exanguinada aislada, que comprende sangre del cordón que comprende células madre hematopoyéticas de sangre de cordón;
- 10
- realizar perfusión pulsátil en máquina de la placenta de mamífero aislada no exanguinada con un flujo pulsátil mediado por presión de una solución de perfusión para producir un líquido de perfusión que comprende sangre de cordón que comprende células madre hematopoyéticas de sangre de cordón;
- 15
- recoger el líquido de perfusión; y
- aislar las células madre hematopoyéticas de sangre de cordón del líquido de perfusión para producir células madre hematopoyéticas de sangre de cordón aislado.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la perfusión se realiza utilizando una fuente de presión.
- 20
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende: después de proporcionarla, guardar la placenta de mamífero aislada en hielo para producir una placenta de mamífero enfriada.
- 25
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución de perfusión comprende heparina.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la perfusión comprende profundir a través de una o dos de las arterias umbilicales.
- 30
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la perfusión comprende además la canulación de las una o dos arterias umbilicales para producir una placenta canulada; y la colocación de la placenta canulada en un circuito de perfusión.
- 35

Figura 1

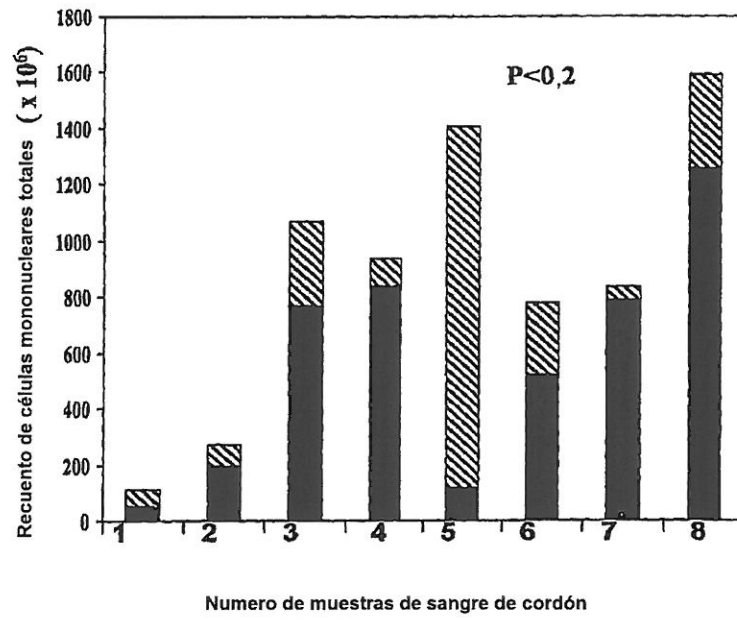


Figura 2

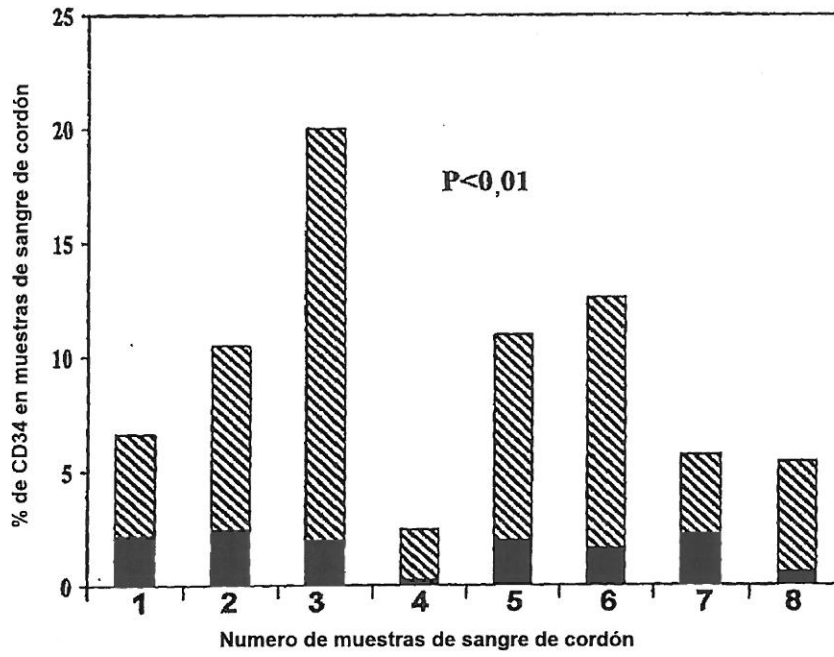


Figura 3

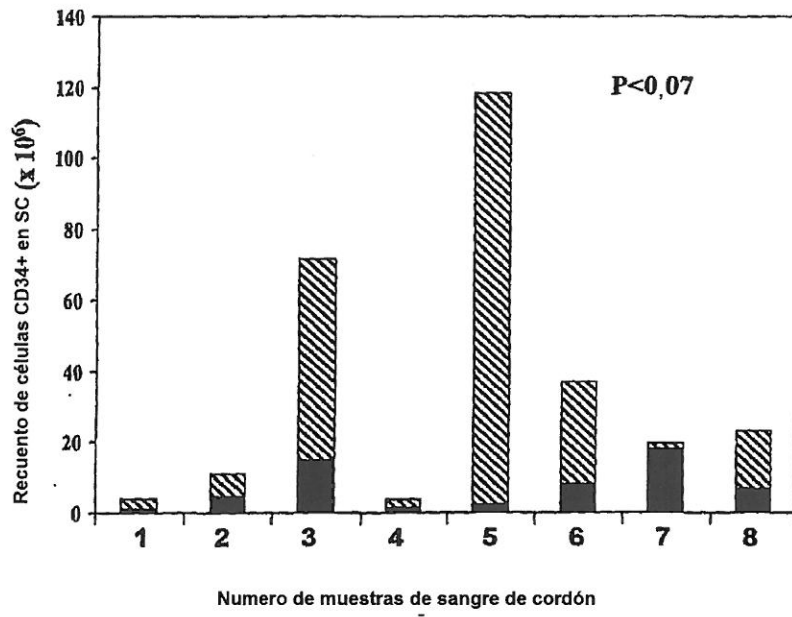


Figura 4

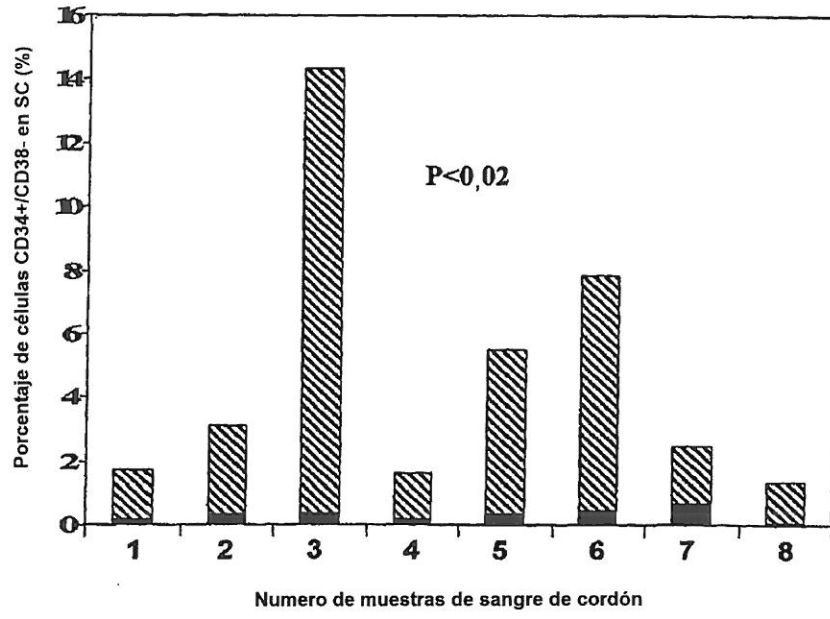


Figura 5

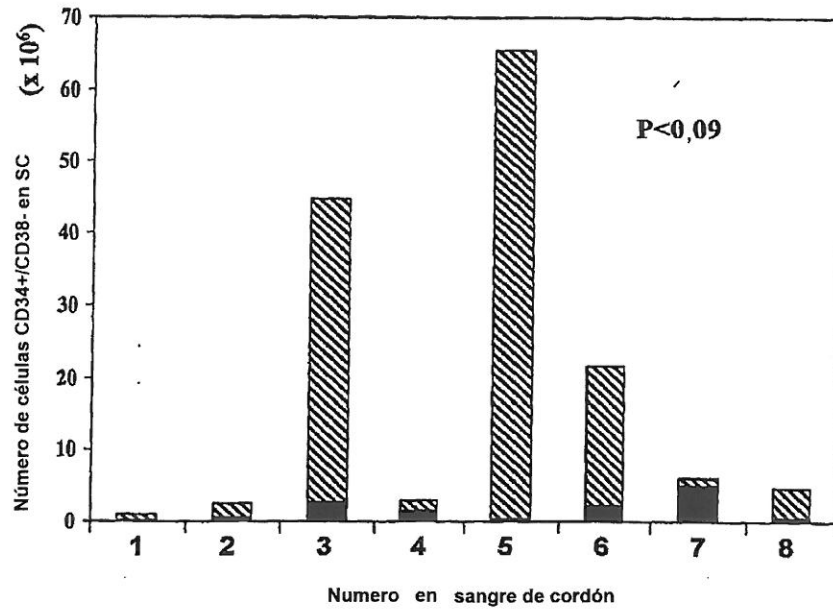


Figura 6

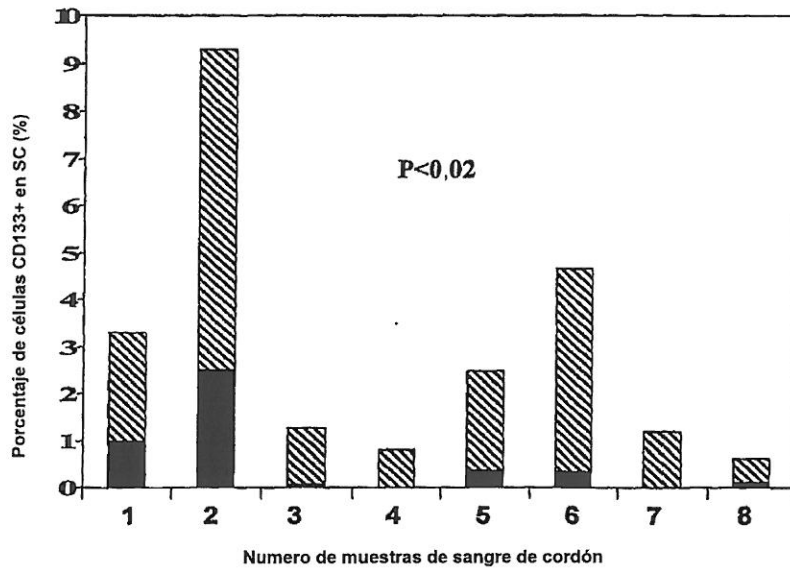


Figura 7

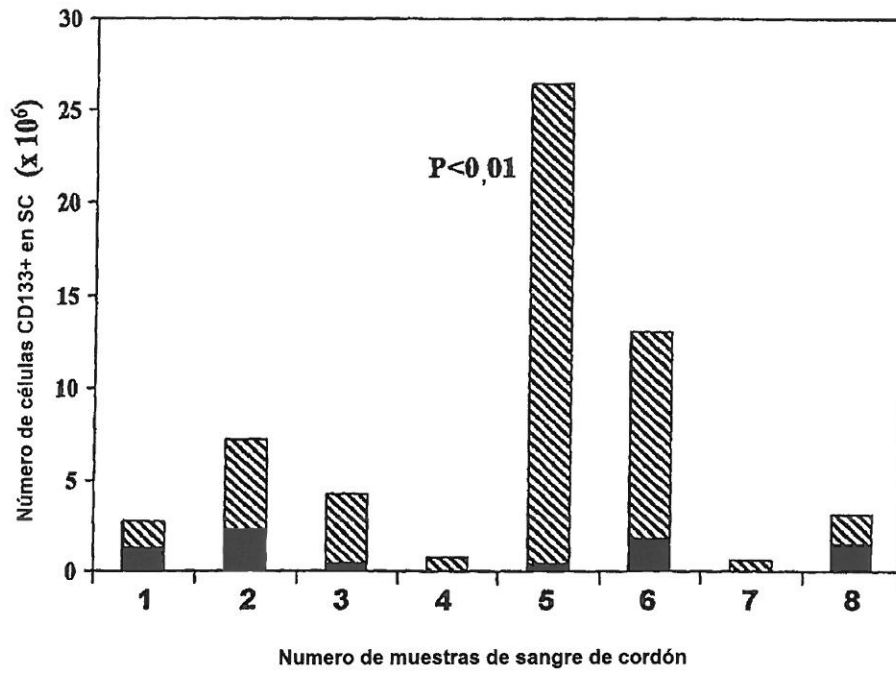


Figura 8A

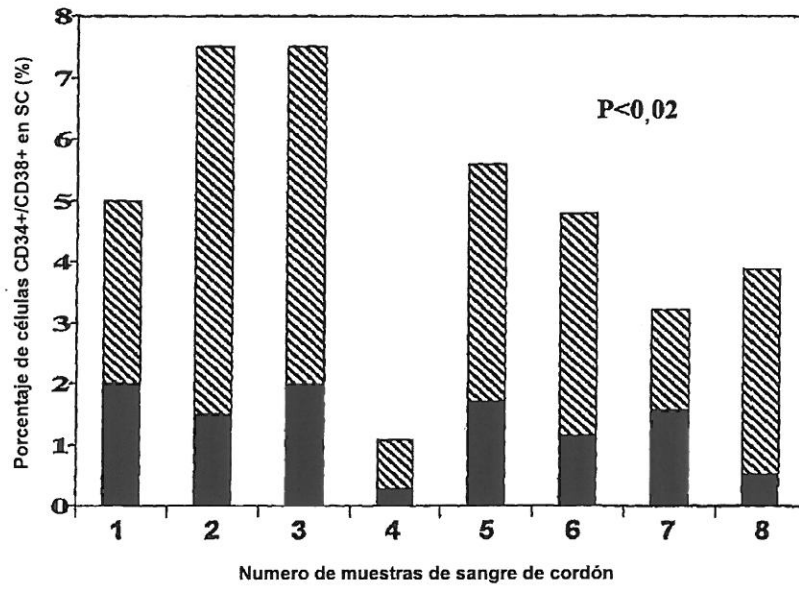


Figura 8B

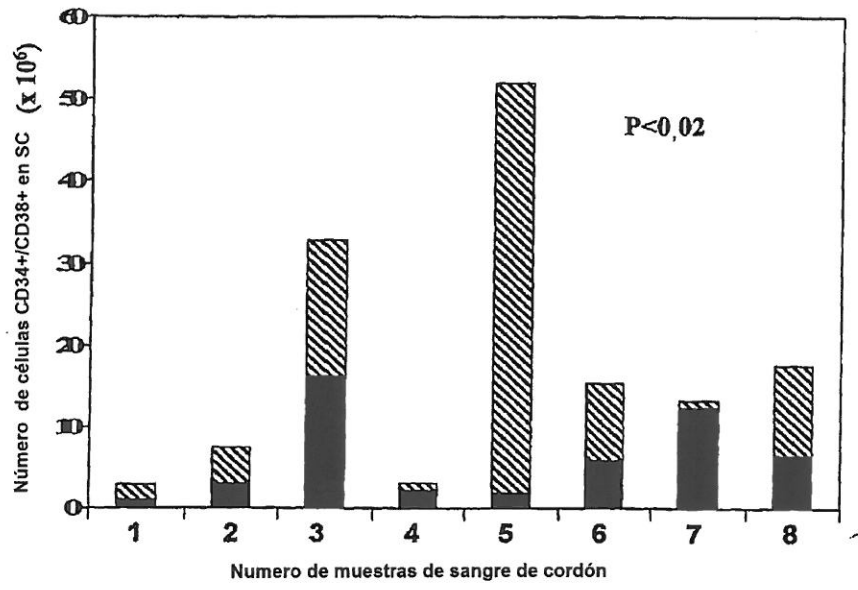


Figura 9A

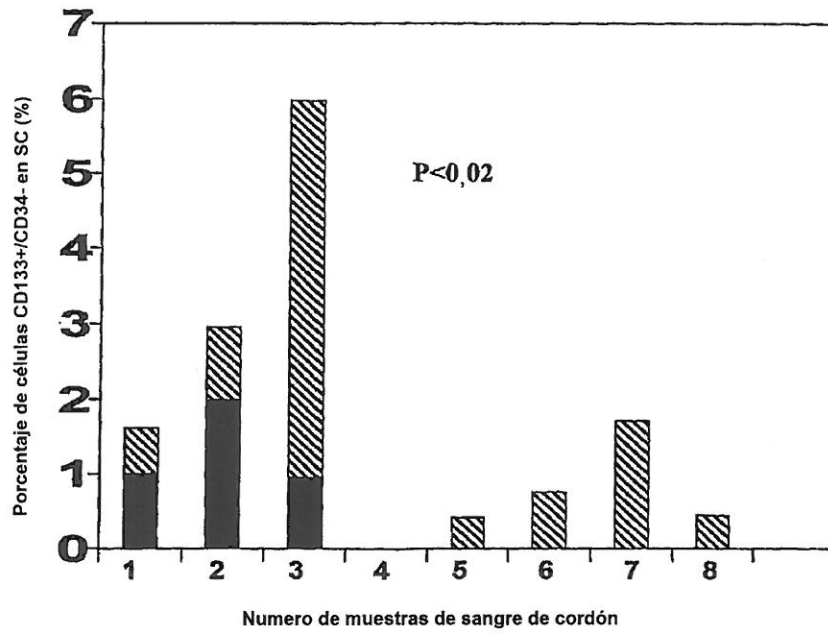


Figura 9B

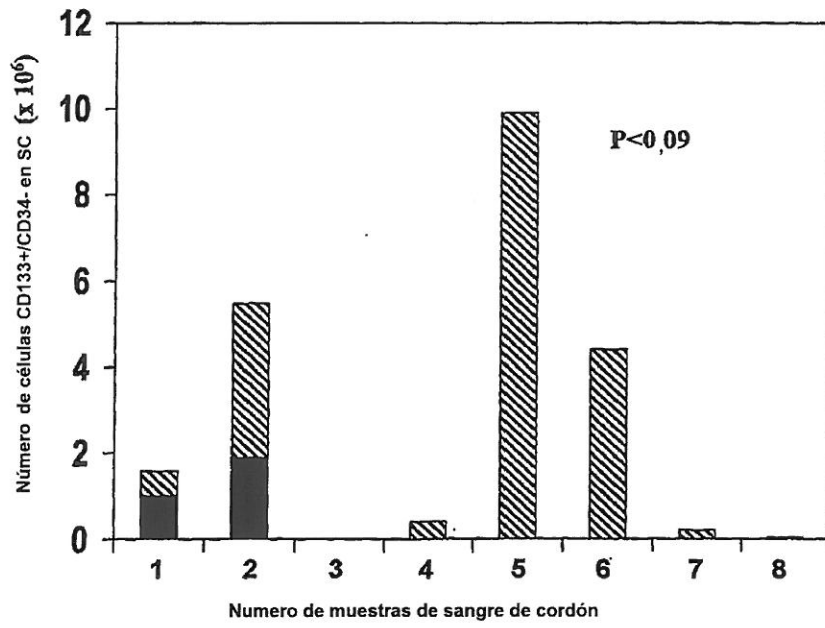


Figura 10A

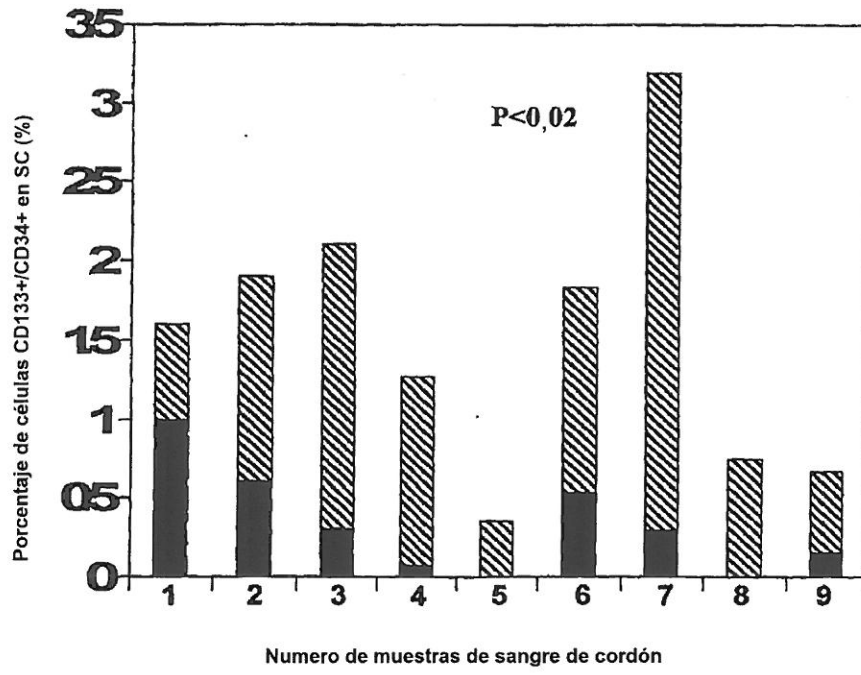


Figura 10B

