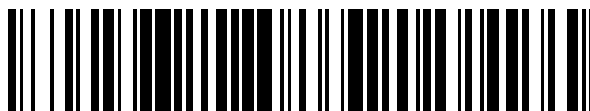


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 402**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06748846 .0**  
96 Fecha de presentación: **29.03.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1864132**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **Composiciones celulares derivadas del amnios, procedimientos de fabricación y usos de las mismas**

30 Prioridad:  
31.03.2005 US 666949 P  
14.07.2005 US 699257 P  
02.12.2005 US 742067 P  
18.01.2006 US 333849

73 Titular/es:  
**STEMNION, INC.**  
**100 TECHNOLOGY DRIVE, SUITE 200**  
**PITTSBURGH, PA 15219, US**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.09.2012**

72 Inventor/es:  
**CLARKE, Diana L.;**  
**SMITH, Charlotte A.;**  
**BANAS, Richard A. y**  
**MARSHALL, Vivienne S.**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.09.2012**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

**ES 2 387 402 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**

Composiciones celulares derivadas del amnios, procedimientos de fabricación y usos de las mismas

**5 Campo de la invención**

El campo de la invención está dirigido a poblaciones celulares derivadas del amnios, a composiciones que comprenden las poblaciones celulares derivadas del amnios, a poblaciones celulares expandidas derivadas del amnios, a procedimientos de crear dichas poblaciones celulares derivadas del amnios, así como a procedimientos de uso. En el presente documento también se describen anticuerpos, en concreto anticuerpos monoclonales, que se unen a las células derivadas del amnios o, como alternativa, a uno o más marcadores proteicos de superficie celular derivados del amnios, a procedimientos para producir los anticuerpos, a procedimientos para usar los anticuerpos y a kits que comprenden los anticuerpos.

**15 Descripción de la técnica relacionada**

Pruebas preliminares sugieren que las células epiteliales del amnios aisladas e introducidas en cultivo exhiben muchas de las características necesarias para definir una población de células madre (Brivanlou, A.H., y col., Science, 2003. 300(5621): Pág. 913-6).

Se ha demostrado que las células madre derivadas de la placenta aisladas de placenta exhiben una expresión proteica heterogénea de los antígenos embrionarios específicos de etapa, SSEA-3 y SSEA-4, TRA 1-60, TRA 1-81, c-kit, y Thy-1 (véanse los documentos US2003/0235563 y US2004/0161419). También se ha demostrado que estas células expresan las proteínas de superficie celular Oct4 y nanog, marcadores expresados por las células madre pluripotenciales. En las condiciones adecuadas, se ha demostrado que las células madre derivadas de placenta se diferencian en células con características de células hepáticas (hepatocitos), células pancreáticas (es decir, células alfa y beta), células del sistema nervioso central (neuronas y glía), células de músculo cardíaco (cardiomiocitos) y células endoteliales vasculares. Las células madre derivadas de placenta son no tumorigénicas tras trasplante (Miki, T., y col., Stem Cells 2005; 23:1549-1559). De hecho, no se han observado tumores en ratones inmunocomprometidos tras trasplante de más de 2 millones de células madre derivadas de placenta, condiciones bajo las cuales las células ES forman tumores no malignos conocidos como teratomas. Los documentos US2003/0235563 y US2004/0161419 divulgan estudios preliminares que indican que las células madre derivadas de placenta cultivadas en Matrigel suplementado con nicotinamida 10 mM durante 14 días expresan insulina y glucagón, así como los marcadores de células pancreáticas PDX1 (faint), Pax6 and Nkx2.2.

Otros han transplantado células amnióticas en voluntarios y pacientes, en un intento de corregir las enfermedades de almacenamiento en lisosomas son pruebas de tumorigenicidad (Tyki-Szymanska, A., y col., Journal of Inherited Metabolic Disease, 1985. 8(3): p. 101-4; Yeager, A.M., y col., American Journal of Medical Genetics, 1985.22(2): Pág. 347-55).

La membrana amniótica se transplanta con regularidad como injerto para la reconstrucción de superficie ocular sin la posterior formación de tumor (John, T., Human amniotic membrane transplantation: past, present, and future. Ophthalmol Clin North Am, 2003. Mar 16(1): Pág. 43-65 vi). Esta falta de tumorigenicidad es una distinción importante entre las células ES y las células madre derivadas de placenta.

Los resultados de estudios preliminares con otras células se divulgan en los documentos WO 2005/017117, W02005/0042595, US 2005/0019865, US2005/0032209, US2005/0037491, US2005/0058631, and US2005/0054093. Los resultados de estudios preliminares con estas otras células indican que tienen el potencial de diferenciarse en varios tipos celulares.

Las membranas amnióticas se han usado clínicamente como vendajes de heridas para pacientes quemados durante más de 100 años para estimular la epitelización, reducir el dolor y prevenir la infección (Bose, B. (1979) Ann R Coil Surg Engl, 61 :444-7; Sawhney,

C. P. (1989) Burns, 15:339-42, Thomson, P. D., Parks, D. H. (1981) Ann Past Surg, 7:354-6). En el documento US2003/0235580 se describe un procedimiento de liberar moléculas terapéuticas en la piel usando células epiteliales amnióticas. En el documento US2004/0057938 se describe el uso de una composición de membrana amniótica humana para profilaxis y tratamiento de enfermedades y afecciones de los ojos y la piel. La patente de EE.UU. N° 4,361,552 describe un procedimiento de tratar una herida o quemadura, que comprende cubrir la superficie de la herida o quemadura con un vendaje amniótico reticulado.

En el documento US2004/0170615 se describe el uso de compuestos expresados en tejido fetal para usar en la reparación de la piel y la mejora del aspecto de la piel.

Wei, y col. (Wei, JP, y col., (2003) Cell Transplantation 12:545-552) han demostrado que las células aisladas de amnios humano pueden normalizar la glucemia en ratones diabéticos inducidos con estreptozocina.

### Antecedentes de la invención

Células madre- Las células madre tienen el extraordinario potencial de desarrollarse en muchos tipos celulares diferentes en el organismo. Al servir como sistema de reparación del cuerpo, teóricamente se pueden dividir sin límite para reponer otras células a lo largo de la vida de una persona. Cuando una célula madre se divide, cada nueva célula tiene el potencial de seguir siendo una célula madre o de convertirse en otro tipo de célula con una función más especializada, tal como una célula muscular, un glóbulo rojo o una célula cerebral. Quizá la potencial aplicación más importante de las células madre humanas es la generación de células y tejidos que se puedan usar para terapias celulares. Se proporcionan ejemplos de estudios con células madre en Tytki-Szymanska, A., y col., *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1985.8(3): pág. 101-4; Yeager, A.M., y col., *American Journal of Medical Genetics*, 1985.22(2): pág. 347-55; John, 1., 2003. 16(1): pág. 43-65 vi).

El tejido de placenta es muy abundante como fuente desechada de un tipo de célula madre denominada células madre derivadas de placenta. Aunque se desechan como parte de las membranas placentarias, el análisis del linaje muestra que, al contrario que otros tejidos de la placenta, la capa epitelial del amnios, de la que se aíslan las células madre derivadas de placenta, solo desciende del epiblasto en el desarrollo embrionario (Figura 1). El epiblasto contiene las células que, en última instancia, se diferenciarán en el embrión y las células que darán lugar a un tejido embrionario adicional, el amnios. Hasta ahora solo se han descrito cuatro tipos celulares descritos en la literatura son pluripotenciales. Estas son la masa celular interna (MCI) del embrión pre-implantación, que da lugar el epiblasto, el propio epiblasto, las células madre embrionarias (ES) y germinales embrionarias (EG). Por tanto, la identificación, purificación y propagación de una población celular pluripotencial a partir de tejido amniótico desechado proporcionarían una fuente extremadamente valiosa de células madre para terapia de sustitución celular.

Con un rendimiento medio de más de 200 millones de células madre derivadas de placenta por placenta, de esta fuente se puede obtener un gran número de células. Si las células madre derivadas de placenta fueran a convertirse en células útiles para la medicina de trasplantes, podrían proporcionar un suministro casi inagotable de material de partida en cualquier parte del mundo. Ninguna otra fuente de células madre proporciona una población de células de partida tan grande y la recolección no requiere un procedimiento invasivo ni destructivo. Además, no existen problemas éticos, religiosos ni sociales asociados con estas de células madre derivadas de placenta, ya que el tejido deriva de la placenta.

Otra consideración importante en las terapias con células madre es la tolerancia al injerto. En seres humanos, inicialmente se pensó que la expresión proteica del marcador de superficie celular HLA-G estaba restringida a sitios privilegiados inmunitarios, como la placenta, así como a células relacionadas, incluidas algunas aisladas del líquido amniótico, macrófagos placentarios y sangre de cordón umbilical, lo que implica su papel en la tolerancia materno-fetal (Urosevic, M. y Dummer, R. (2002) *ASHI Quarterly*; 3rd Quarter 2002:106-109). Adicionalmente, en estudios sobre aceptación de injertos cardíacos se ha sugerido que la expresión proteica de HLA-G puede potenciar la tolerancia al injerto (Lila, N., y col. (2000) *Lancet* 355:2138; Lila, N. y col. (2002) *Circulation* 105:1949-1954). La proteína HLA-G no se expresa sobre la superficie de células madre embrionarias sin diferenciar o diferenciadas (Drukker, M. y col. (2002) *PNAS* 99(15):9864-9869). Por tanto, es deseable que las células madre destinadas a terapias basadas e células expresen la proteína HLA-G.

Cicatrización de heridas- Se ha demostrado que las células derivadas de placenta secretan muchas citoquinas y factores de crecimiento, incluidas las prostaglandinas E2, PGES, TGF- $\beta$ , EGF, IL-4, IL-8, TNF, interferones, actividad A, nolgín, bFGF, algunos factores neuroprotectores y muchos factores angiogénicos (Koyano y col., (2002) *Develop. Growth Differ.* 44: 103-112; Blumenstein y col. (2000) *Placenta* 21 :21 0-217; Tahara y col. (1995) *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 80:138-146; Paradowska y col. (1997) *Placenta* 12:441-446; Denison y col. (1998) *Hum. Reprod.* 13:3560-3565; Keelan y col. (1998) *Placenta* 19:429-434; Uchida y col., (2000) *J. Neurosci. Res.* 62:585-590; Sun y col., (2003) *J.Clin. Endocrinol. Metabol.* 88(11 ):5564-5571; Marvin y col., (2002) *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187(3):728-734).

Muchas de estas citoquinas están asociadas con la cicatrización de heridas y algunas tienen el crédito de la contribución a la cicatrización sin cicatrices en el feto.

En EE.UU. se realizan cada año aproximadamente 50 millones de procedimientos quirúrgicos- Otras 50 millones de heridas son el resultado de lesiones traumáticas. El posterior fracaso de la cicatrización de heridas agudas en cualquier sitio anatómico tiene como resultado un incremento de la morbilidad y la mortalidad. Ejemplos no limitantes de fracasos de cicatrización aguda incluyen músculo, dehiscencias faciales y cutáneas, formación de hernia por incisión, fistulización gastrointestinal y pérdidas anastomósicas vasculares. Además de la discapacidad funcional inmediata, las heridas agudas que fracasan normalmente se convierten en cicatrices incapacitantes.

Las hernias quirúrgica en la pared abdominal proporcionan un excelente paradigma del estudio del mecanismo y resultados del fracaso de la cicatrización de heridas agudas. En series prospectivas, grandes y bien controladas se ha demostrado que el 11-20 % de más de 4 millones de cierres faciales de la pared abdominal fallan, lo que conduce a la formación de hernias quirúrgicas ventrales. Incluso tras la reparación de fallos de heridas agudas, las tasas de recurrencia siguen siendo de hasta el 58 %. Las mejoras en el material de sutura, la distancia entre puntos, la

distancia a los puntos desde el margen de la herida y la administración de antibióticos profilácticos para evitar la infección han reducido significativamente las tasas de dehiscencias de heridas agudas clínicamente obvias, pero solo han conllevado pequeñas disminuciones en las tasas de formación y recurrencia de hernia ventral. La introducción de prótesis tisulares, normalmente mallas sintéticas, para crear un puente o parche sin tensiones del defecto mio-fascial redujo primero las tasas de recurrencia significativamente, lo que avala el concepto de que los factores mecánicos predominan en la patogenia de las hernias recurrentes.

Las enseñanzas quirúrgicas tradicionales es que el fallo de la herida por laparotomía es un acontecimiento raro que acumula tasas de "dehiscencia fascial" comunicadas de alrededor del 0,1 %. En un estudio prospectivo se descubrió que la tasa verdadera de fallo de herida por laparotomía está cerca del 11 % y que la mayoría de estos (94 %) forma hernias quirúrgicas durante los primeros tres años tras las intervenciones abdominales. Esto es más consistente con la elevada incidencia de formación de heridas quirúrgicas. La tasa real de fallo de herida por laparotomía es, por tanto, 100 veces la que piensan la mayoría de los cirujanos. En términos más sencillos, la mayoría de las hernias quirúrgicas proceden de fallos de heridas por laparotomía clínicamente ocultas o de dehiscencias faciales ocultas. La piel que sobresale de la herida cicatriza, lo que oculta el defecto miofascial subyacente. Este mecanismo de fallo de herida por laparotomía mecánico precoz es más consistente con la ciencia moderna de cicatrización de heridas agudas. No existen otros modelos de cicatrización de heridas agudas, lo que sugiere que una herida aguda que ha cicatrizado con éxito se rompe y falla mecánicamente más tarde. Este mecanismo es también único en cuanto a que supone que la mayoría de los fallos de heridas por laparotomía de la pared abdominal se produce en huéspedes sin defecto de cicatrización de la herida claramente identificable. Un modelo de fallo de herida por laparotomía desarrollado tuvo como resultado hernias quirúrgicas. El diseño de la aleta cutánea paramediana aísla la piel y las incisiones miofasciales y permite estudiar simultáneamente la reparación de heridas por laparotomía en la línea media y la reparación dérmica paramediana. Las reparaciones cutáneas y miofasciales se pueden controlar para alcanzar un 100 % de reparaciones intactas o un 100 % de fallos estructurales y dehiscencias en la herida.

Cosmética- La piel fetal tiene mecanismos de reparación más eficaces y, una vez dañada, puede cicatrizar sin la formación de cicatrices. Esta capacidad parece requerir el sistema inmunitario fetal, suero fetal o líquido amniótico (Bleacher J C, y col., J Pediatr Surg 28: 1312-4, 1993); Ihara S, Motobayashi Y., Development 114: 573-82. 1992). Dichas capacidades del tejido fetal condujeron al uso sugerido de compuestos producidos por tejido fetal para regenerar y/o mejorar el aspecto de la piel (véase, por ejemplo, el documento US 2004/0170615).

Diabetes- La terapia tradicional con insulina prolonga la vida de un paciente con diabetes de tipo 1 pero no previene las complicaciones sistémicas a largo plazo que surgen a medida que la enfermedad progresa. Incluso el mejor régimen de inyección/infusión para monitorizar y controlar los niveles de glucosa sistémica dentro de un intervalo conduce a un deterioro de la microvascularización tisular resultante en la plétora de complicaciones relacionadas con la salud asociadas con la enfermedad. Estas complicaciones se pueden atribuir a la incapacidad de la insulina inyectable o de administración oral para sustituir completamente la secreción de insulina de un complemento normal de los islotes pancreáticos. El fracaso de la insulina como sustituto de las células beta de los islotes pancreáticos puede explicarse en gran medida cuando se examina la arquitectura celular de un islote pancreático. Es necesaria la regulación intercelular intensiva de la secreción hormonal conseguida por proximidad de las células de los islotes inmediatos para prevenir las grandes fluctuaciones temporales de los niveles de glucosa en sangre que son responsables de los daños celulares y las consiguientes complicaciones de la enfermedad.

Actualmente, el trasplante de páncreas de cadáver o el aislamiento y trasplante de islotes de cadáver son los únicos tratamientos alternativos a la administración de insulina existentes para pacientes que dependen de la insulina para controlar la diabetes. La escasez de tejidos donantes reserva estas terapias alternativas a pacientes seleccionados que no pueden estabilizar adecuadamente los niveles de glucosa en sangre usando regímenes de infusión/inyección de insulina tradicionales.

Este interrogante perfila la diabetes como principal candidata para las terapias basadas en células. Esta candidatura es más fuerte por la calidad de únicos de los islotes para funcionar como unidades multicelulares funcionales autocontenidas de detección de glucosa.

Asimismo, se han realizado estudios para estimular la diferenciación de las células madre, las células progenitoras o su progenie usando dominios de transducción de proteína (PTD), tales como los contenidos en la proteína TAT del VIH-1. Se ha descubierto que la proteína TAT del VIH-1 entra en las células de un modo dependiente de concentración e independiente de receptor. Se han realizado estudios con PTD de TAT para determinar su utilidad en la liberación de proteínas en las células (véase, por ejemplo, el documento US 2005/0048629, Wadia y col., 2004, Nature Medicine 10:310-315 y Krosl y col., 2003, Nature Medicine 9:1-10). Dichas proteínas se pueden usar para estimular la diferenciación de las células madre, las células progenitoras o su progenie.

### Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona:

- Una población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios que se realiza mediante el

procedimiento de:

-

- (a) disociar usando una proteasa como reactivo de disociación de las células derivadas del amnios de un amnios aislado de una placenta;
- 5 (b) recolectar las células derivadas del amnios disociadas; y
- (c) cultivar las células derivadas del amnios recogidas en medio de cultivo que no contienen materiales derivados de animales distintos a la seroalbúmina.

También se proporciona:

10

- la población sustancialmente purificada descrita en el presente documento, que es una composición expandida de células derivada del amnios
- una composición que comprende medio acondicionado obtenido de la población o composición descrita anteriormente

15

- una composición farmacéutica, que comprende la población o la composición descrita anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- la composición descrita anteriormente para uso en terapia
- el uso de la composición descrita anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la cicatrización de heridas o la pérdida de audición en un sujeto que sufre una afección que se beneficiaría del mismo

20

- una preparación cosmética que comprende una población o composición descrita anteriormente
- Un procedimiento de obtener una población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios que comprende las etapas de

25

- (a) disociar usando una proteasa como reactivo de disociación de las células derivadas del amnios de un amnios aislado de una placenta;
- (b) recolectar las células derivadas del amnios disociadas; y
- (c) cultivar las células derivadas del amnios recogidas en medio de cultivo que no contienen materiales derivados de animales distintos a la seroalbúmina humana

30

Aunque las poblaciones heterogéneas de células madre derivadas de placenta se han caracterizado anteriormente usando marcadores proteicos de superficie de células madre embrionarias establecidas tales como c-kit, SSEA-3, y SSEA-4, se requiere un conjunto de marcadores proteicos útiles para caracterizar y aislar una población preferida sustancialmente purificada de células. La población de células sustancialmente purificada, denominadas células derivadas del amnios, podría después discriminarse de otras células como las células madre embrionarias, células madre mesenquimatosas o células madre derivadas de adulto. En el presente documento se describen marcadores proteicos capaces de caracterizar y aislar células derivadas del amnios de células madre derivadas de placenta. También se describe el uso de dichos marcadores proteicos como antígenos para preparar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos de dichos marcadores proteicos.

40

De acuerdo con esto, e un primer caso se describe una población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios que es negativa para la expresión de los marcadores proteicos CD90 y CD117.

45

En un segundo caso, se describe una población sustancialmente purificada del primer caso que además es negativa para la expresión del marcador proteicos CD105.

En un tercer caso, se describe una población sustancialmente purificada del primer caso que es positiva para la expresión del marcador proteicos CD29.

50

En un cuarto caso, se describe una población sustancialmente purificada del tercer caso que es negativa para la expresión del marcador proteicos CD105.

55

En un quinto caso se describe una población sustancialmente purificada del tercer caso que además es positiva para la expresión de al menos uno de los marcadores proteicos seleccionados del grupo constituido por CD9, CD10, CD26, CD71, CD166, CD227, EGF-R, SSEA-4 y HLA-G.

60

En un sexto caso se describe una población sustancialmente purificada del cuarto caso que además es positiva para la expresión de al menos uno de los marcadores proteicos seleccionados del grupo constituido por CD9, CD10, CD26, CD71, CD166, CD227, EGF-R, SSEA-4 y HLA-G.

En un séptimo caso se describe una población sustancialmente purificada del segundo caso que además es negativa para la expresión de al menos uno de los marcadores proteicos seleccionados del grupo constituido por CD 140b, telomerasa, CD34, CD44 y CD45

65

En un octavo caso se describe una población sustancialmente purificada del cuarto caso que además es negativa para la expresión de al menos uno de los marcadores proteicos seleccionados del grupo constituido por CD 140b,

telomerasa, CD34, CD44 y CD45

En un noveno caso se describe una población sustancialmente purificada del sexto caso que además es negativa para la expresión de al menos uno de los marcadores proteicos seleccionados del grupo constituido por CD 140b, telomerasa, CD34, CD44 y CD45

En un décimo caso se describe una población de células derivadas del amnios de los casos uno a nueve, que es una composición. En un caso preferido, la composición es una composición farmacéutica.

10 En un undécimo caso se describe un procedimiento de obtener la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del primer caso, que comprende: a) proporcionar una población de células derivadas del amnios; b) poner en contacto la población de células derivadas del amnios con anticuerpos anti-CD90 y anti-CD117; y c) separar las células derivadas del amnios que se unen a los anticuerpos de las células que no se unen a los anticuerpos de modo que se obtiene la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del primer caso que no se unen a los anticuerpos.

15 En un duodécimo caso se describe un procedimiento de obtener la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del segundo caso, que comprende: a) proporcionar una población de células derivadas del amnios; b) poner en contacto las células con los anticuerpos anti-CD90, anti-CD 117, and anti-CD 105 y c) separar las células que se unen a los anticuerpos de las células que no se unen a los anticuerpos de modo que se obtiene la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del segundo caso que no se unen a los anticuerpos.

20 En un decimotercero se describe un procedimiento de obtener la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del séptimo caso, que comprende: a) proporcionar una población de células derivadas del amnios; b) poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD 117 y anti-CD105 y ii) con al menos un anticuerpo seleccionado del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD140b, anti-CD34, anti-CD44 y anti-CD45; y c) separar las células que se unen a los anticuerpos de (i) de las células que no se unen a los anticuerpos de (i) y separar las células que se unen a los anticuerpos de (ii) de las células que no se unen a los anticuerpos de (ii); y de modo tal que se obtiene la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del séptimo caso que no se unen a los anticuerpos de (i) y de (ii).

25 En un decimocuarto caso se describe un procedimiento de obtener la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del tercer caso, que comprende: a) proporcionar una población de células derivadas del amnios; b) poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD 117 y ii) con un anticuerpo anti-CD29; y c) separar las células que no se unen a los anticuerpos de (i) de las células que sí se unen a los anticuerpos de (i) y separar las células que no se unen a los anticuerpos de (ii) de las células que sí se unen al anticuerpo de (ii); y de modo tal que se obtiene la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del tercer caso que no se unen a los anticuerpos de (i) y sí se unen al anticuerpo de (ii).

30 En un decimoquinto caso se describe un procedimiento de obtener la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del cuarto caso, que comprende: a) proporcionar una población de células derivadas del amnios; b) poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD 117 y anti-CD105 y ii) con un anticuerpo anti-CD29; y c) separar las células que no se unen a los anticuerpos de (i) de las células que sí se unen a los anticuerpos de (i) y separar las células que no se unen al anticuerpo de (ii) de las células que sí se unen al anticuerpo de (ii), de modo tal que se obtiene la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del cuarto caso que no se unen a los anticuerpos de (i) y sí se unen al anticuerpo de (ii).

35 En un decimosexto caso se describe un procedimiento de obtener la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del quinto caso, que comprende: a) proporcionar una población de células derivadas del amnios; b) poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD 117 y (ii) anticuerpos anti-CD29 y (iii) con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-C09, anti-C010, anti-C026, anti-C071, anti-C0166, anti-C0227, anti-EGF-R, anti-SSEA-4 y anti-HLA-G; y c) separar las células que no se unen al anticuerpo de (i) de las células que sí se unen a los anticuerpos de (i) y separar las células que no se unen al anticuerpo de (ii) de las células que sí se unen al anticuerpo de (ii), y separar las células que no se unen a los anticuerpos de (iii) de las células que sí se une a los anticuerpos de (iii) de modo tal que se obtiene la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del quinto caso que no se unen a los anticuerpos de (i) y, sí se unen al anticuerpo de (ii) y sí se unen a los anticuerpos de (iii).

40 En un decimoséptimo caso se describe un procedimiento de obtener la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del sexto caso, que comprende: a) proporcionar una población de células derivadas del amnios; b) poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD 117 y anti-CD105 y (ii) y los anticuerpos anti-CD29 y (iii) con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD9, anti-CD10, anti-CD26, anti-CD71, anti-CD166, anti-CD227, anti-EGF-R, anti-SSEA-4 y anti-HLA-G; y c) separar las células que no se unen al anticuerpo de (i) de las células que sí se unen a los anticuerpos de (i) y separar las células que no se unen al anticuerpo de (ii) de las células que sí se unen al anticuerpo de (ii), y separar las células

que no se unen a los anticuerpos de (iii) de las células que sí se une a los anticuerpos de (iii) de modo tal que se obtiene la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del sexto caso que no se unen a los anticuerpos de (i) y, sí se unen al anticuerpo de (ii) y sí se unen a los anticuerpos de (iii).

5 En un decimotercero caso se describe un procedimiento de obtener la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del octavo caso, que comprende: a) proporcionar una población de células derivadas del amnios; b) poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD 117 y anti-CD105 y (ii) y los anticuerpos anti-CD29 y (iii) con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD140b, anti-CD34, anti-CD44, y anti-CD45; y c) separar las células que no se unen al anticuerpo de (i) de las  
10 células que sí se unen a los anticuerpos de (i) y separar las células que no se unen al anticuerpo de (ii) de las células que sí se unen al anticuerpo de (ii), y separar las células que no se unen a los anticuerpos de (iii) de las células que sí se une a los anticuerpos de (iii) de modo tal que se obtiene la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del octavo caso que no se unen a los anticuerpos de (i) sí se unen al anticuerpo de (ii) y no se unen a los anticuerpos de (iii).

15 En un decimonoveno caso se describe un procedimiento de obtener la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del noveno caso, que comprende: a) proporcionar una población de células derivadas del amnios; b) poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD 117 y anti-CD105 y (ii) y los anticuerpos anti-CD29 y (iii) uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD140b, anti-CD34, anti-CD44, y anti-CD45 y (iv) uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD9, anti-CD10, anti-CD26, anti-CD71, anti-CD166, anti-CD227, anti-EGF-R, anti-SSEA-4, y anti-HLA-G; y c) separar las células que no se unen al anticuerpo de (i) de las células que sí se unen a los anticuerpos de (i) y separar las células que no se unen al anticuerpo de (ii) de las células que sí se unen al anticuerpo de (ii), y separar las células que no se unen a los anticuerpos de (iii) de las células que sí se unen a los anticuerpos de (iii) y  
20 separar las células de las que se unen al anticuerpo de (iv) de las células que no se unen a los anticuerpos de (iv), de modo tal que se obtiene la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios del noveno caso que no se unen a los anticuerpos de (i) sí se unen al anticuerpo de (ii), no se unen a los anticuerpos de (iii) y sí se unen a los anticuerpos de (iv).

30 En un vigésimo caso se describe un procedimiento de obtener la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios que comprende: a) proporcionar una población de células derivadas del amnios; b) poner en contacto las células con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD105, anti-CD90, anti-CD117, anti-CD140b, anti-CD34, anti-CD44 y anti-CD45; y uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD29, anti-CD9, anti-CD10, anti-CD26, anti-CD71, anti-CD166, anti-CD227, anti-EGF-R, anti-SSEA-4, y anti-HLA-G; y c) separar las células que no se unen a los anticuerpos de (i) de las células que sí se unen al anticuerpo de (i) y separar las células que no se unen a los anticuerpos de (ii) de las células que sí se unen al anticuerpo de (ii), de modo tal que se obtiene la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios que no se unen a los anticuerpos de (i) y sí se unen al anticuerpo de (ii).

40 En un vigésimo primer caso se describe el procedimiento de los casos 11 a 20, en el que las células se separan mediante clasificación FACS.

45 En un vigésimo segundo caso se describen anticuerpos de los aspectos 11 a 20 que son anticuerpos monoclonales, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, una scFv o un fragmento o derivado de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

50 Además de los casos 1 a 22, casos adicionales proporcionan poblaciones de células derivadas del amnios agrupadas y expandidas que proporcionan varias ventajas sobre las composiciones de células derivadas de placenta descritas anteriormente, así como composiciones de células madre embrionarias.

55 De acuerdo con esto, un vigésimo tercer caso es las células derivadas del amnios del primer caso que son una composición de células derivadas del amnios expandidas. Preferentemente, la composición del caso vigésimo tercero carece de animales. Más preferentemente, la composición es una composición de células derivadas de amnios agrupadas.

60 En un vigésimo cuarto caso se describe una composición que comprende medio acondicionado obtenido de la composición de células derivadas del amnios expandidas del vigésimo tercer caso.

65 En un vigésimo quinto caso se describe una composición que comprende lisado celular obtenido de la composición de células derivadas del amnios del vigésimo tercer caso.

En un vigésimo sexto caso es la composición de células derivadas del amnios expandidas del vigésimo tercer caso que tiene una concentración de al menos  $500 \times 10^6$  células derivadas del amnios/g del amnios de partida.

En un vigésimo séptimo caso es un procedimiento de crear un hepatocito que comprende diferenciar, *in vitro* o *in vivo*, una población de células derivadas del amnios del primer caso.

En un trigésimo caso se describe un procedimiento de crear un cardiomiocito que comprende diferenciar, *in vitro* o *in vivo*, una población de células derivadas del amnios del primer caso.

5 En un trigésimo segundo caso se describe un procedimiento para estimular la cicatrización acelerada de heridas en un paciente con lesiones que lo necesita, que comprende administrar al paciente una o más composiciones de células derivadas de placenta. Preferentemente, la composición de células derivadas de placenta es una composición de células derivadas del amnios expandidas. Preferentemente, la composición se administra en un armazón o matriz. En un caso específico, el armazón o matriz es tejido amniótico. Preferentemente, la herida se selecciona del grupo constituido por heridas mecánicas, térmicas, agudas, crónicas, infectadas y estériles.  
10 Preferentemente, el paciente con daños es un ser humano.

En un trigésimo tercer caso se describe una preparación cosmética que comprende una o más composiciones de células derivadas de placenta. Preferentemente, la composición de células derivadas de placenta es una composición de células derivadas del amnios expandidas.  
15

En un trigésimo cuarto caso se describe un procedimiento para tratar la pérdida de audición en un paciente que lo necesite, que comprende administrar al paciente una o más composiciones de células derivadas de placenta. Preferentemente, la composición de células derivadas de placenta es una composición de células derivadas del amnios expandidas.  
20

En un trigésimo quinto caso se describe un procedimiento de proliferar células madre embrionarias, que comprende usar las células derivadas del amnios del primer caso como capa de alimentación. Una realización preferida de este caso es una que carece de productos animales.

25 Además de los casos 23 a 35, también se describen composiciones que comprenden poblaciones de células derivadas del amnios diferenciadas, procedimiento para identificar dichas poblaciones, procedimientos de preparar dichas poblaciones y procedimientos de usarlas.

### Definiciones

30 Los residuos de aminoácidos descritos en el presente documento se prefiere que estén en la forma isomérica "L". No obstante, los residuos en la forma isomérica "D" pueden estar sustituidos por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre que el polipéptido conserve la función deseada. NH<sub>2</sub> se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxi de un polipéptido.  
35

Como se define en el presente documento, "aislado" se refiere a material extraído de su ambiente original y, por tanto, está alterado "por la mano del hombre" con respecto a su estado natural.

40 Como se define en el presente documento, "gen" es el segmento de ADN implicado en producir una cadena polipeptídica; incluye regiones precedentes y posteriores a la región de codificación, así como secuencias intermedias (intrones) entre los segmentos de codificación individuales (exones).

45 Como se usar en el presente documento, la expresión "marcador proteico" significa cualquier molécula proteica característica de la membrana plasmática de una célula o, en algunos casos, de un tipo de célula específico.

50 Como se usar en el presente documento, "enriquecido" significa concentrar de forma selectiva o incrementar la cantidad de uno o más materiales mediante eliminación de los materiales no deseados o selección y separación de materiales deseables a partir de una mezcla (es decir, separar las células con marcadores celulares específicos de una población de células heterogénea en la que no todas las células de la población expresan el marcador).

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente purificad" quiere decir una población de células sustancialmente homogénea para un marcador concreto o combinación de marcadores. Por sustancialmente homogéneo se quiere decir al menos un 90 % homogéneo y preferentemente un 95 % homogéneo para un marcador concreto o combinación de marcadores.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "biblioteca de anticuerpos monoclonales" significa una colección de al menos un anticuerpo monoclonal útil para identificar marcadores proteicos únicos de células derivadas del amnios o generar poblaciones sustancialmente purificadas de células derivadas del amnios. Como se define en el presente documento, "específico de" significa que el o los anticuerpos se unen específicamente a células derivadas del amnios, pero no a células madre embrionarias, a células madre mesenquimatosas o a células madre derivadas de adulto.

65 El término "placenta", como se usa en el presente documento, significa tanto la placenta pretérmino como la placenta a término.



Como se usa en el presente documento, la expresión “células totipotenciales” tendrá el significado siguiente: En mamíferos, las células totipotenciales tienen el potencial de convertirse en cualquier tipo de célula e el organismo adulto; cualquier tipo celular de las membranas extraembrionarias (p. ej., la placenta). Las células totipotenciales son el huevo fertilizado y aproximadamente las primeras 4 células producidas mediante su escisión.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “células madre pluripotenciales” tendrá el significado siguiente: Las células madre pluripotenciales son células madre verdaderas con el potencial de fabricar cualquier célula diferenciada en el cuerpo, pero que no pueden contribuir a fabricar los componentes de las membranas extraembrionarias que derivan del trofoblasto. El amnios se desarrolla del epiblasto, no del trofoblasto. Hasta la  
10 fecha se han confirmado tres tipos de células madre pluripotenciales: Células madre embrionarias (ES) (también pueden ser totipotenciales en primates), células germinales embrionarias (EG) y células de carcinoma embrionario (EC). Estas células EC se pueden aislar de teratocarcinomas, un tumor que en ocasiones se produce en la gónada de un feto. Al contrario que las otras dos, normalmente son aneuploides.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “células madre multipotenciales” son células madre verdaderas, pero solo se pueden diferenciar en un número limitado de tipos. Por ejemplo, la médula ósea contiene células madre multipotenciales que dan lugar a todas las células de la sangre pero pueden no ser capaces de diferenciarse en otros tipos celulares.

20 Las “células derivadas del amnios” son una población de células que derivan del amnios de la placenta. Las células derivadas del amnios crecen sin capas de alimentación, no expresan la proteína telomerasa y no son tumorigénicas. Las células derivadas del amnios no expresan la proteína marcadora de células madre hematopoyéticas CD34. La ausencia de células positivas para CD34 en esta población indica que los aislamientos no están contaminados con células madre hematopoyéticas, tales como sangre de cordón umbilical o fibroblastos embrionarios. Prácticamente  
25 el 100 % de las células reaccionan con anticuerpos frente a citoqueratinas de bajo peso molecular, lo que confirma su naturaleza epitelial. Las células derivadas del amnios recién aisladas no reaccionarán con anticuerpos frente a los marcadores de células progenitoras/madre c-kit and Thy-1. En la técnica se conocen varios procedimientos usados para obtener células de placenta a término o pre-término (véase, por ejemplo, el documento US 2004/0110287; Anker y col., 2004, Stem Cells 22: 1338-1345; Ramkumar y col., 1995, Am. J. Ob. Gyn. 172:493-500). No obstante,  
30 los procedimientos usados en el presente documento proporcionan mejores composiciones y poblaciones de células.

La expresión “composición de células derivadas de placenta”, como se usa en el presente documento, incluye las células y composiciones descritas en la presente solicitud y en los documentos US2003/0235563, US2004/0161419,  
35 US2005/0124003, las solicitudes provisionales de EE.UU. nº 60/666,949, 60/699,257, 60/742,067 y la solicitud de EE.UU. Nº 11/333,849.

Con la expresión “sin animales”, cuando se hace referencia a composiciones, condiciones de crecimiento, medios de cultivo etc. descritos en el presente documento, se quiere decir que en la preparación, crecimiento, cultivo,  
40 expansión o formulación de la composición o procedimiento no se usan materiales derivados de animales, tales como suero derivado de animal, aparte de los materiales humanos, tales como proteínas humanas nativas o producidas de forma recombinante.

Con el término “expandidas”, en referencia a las composiciones de células derivadas del amnios, se quiere decir que la población de células derivadas del amnios constituye una concentración significativamente mayor de células multipotenciales que la obtenida usando los procedimientos anteriores. El nivel de células multipotenciales por gramo de tejido amniótico en las composiciones expandidas es de al menos 50 y hasta 150 veces más alto que el número de células en el cultivo primario tras 5 pases, en comparación con un incremento de aproximadamente 20 veces en dichas células usando los procedimientos anteriores. De acuerdo con esto, una población “expandida”  
50 tiene una mejora de al menos 2 veces y hasta 10 veces el número de células por gramo de tejido amniótico sobre los procedimientos anteriores. Con el término “expandido” se quiere decir que cubre solo las situaciones en las que una persona ha intervenido para elevar la proporción de las células derivadas del amnios. Como se usa en el presente documento, “pase” o “paso” se refiere al subcultivo de células. Por ejemplo, las células aisladas del amnios se denominan células primarias. Dichas células se expanden en cultivo cultivándolas en el medio de crecimiento  
55 descrito en el presente documento. Cuando estas células primarias se subcultivan, cada ronda de subcultivo se denomina un pase. Como se usa en el presente documento, “cultivo primario” quiere decir la población de células derivadas del amnios aisladas recientemente.

Como se usa en el presente documento, un “medio acondicionado” es un medio en el que se ha cultivado una célula o población de células específicas y se han extraído después. Cuando las células se cultivan en un medio, pueden secretar factores celulares que pueden proporcionar soporte o afectar al comportamiento de otras células. Dichos factores incluyen, entre otros, hormonas, citoquinas, proteínas de la matriz extracelular (MEC), vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado. Ejemplos de procedimientos de preparar medios acondicionados se describen en la patente de EE.UU. Nº 6.372.494. Como usa  
60 en el presente documento, medio acondicionado también se refiere a componentes, como proteínas, que se recuperan y/o purifican del medio acondicionado o de células derivadas del amnios.

Como usa en el presente documento, el término “lisado” hace referencia a la composición obtenida cuando las células derivadas del amnios se lisan y los residuos celulares (p. ej., las membranas celulares) se eliminan. Esto se puede conseguir por medios mecánicos, congelando y descongelando, mediante el uso de detergentes, tales como EDTA, o mediante digestión enzimática usando, por ejemplo, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas.

5 Como usa en el presente documento, el término “sustrato” quiere decir un recubrimiento definido sobre una superficie a la que las células se unen, se cultivan y/o migran. Como se usa en el presente documento, el término “matriz” significa una sustancia en la que las células crecen o sobre la que pueden o no estar definida en sus componentes. La matriz incluye sustancias biológicas y no biológicas. Como se usa en el presente documento, el término “armazón” significa una estructura tridimensional (3D) (sustrato y/o matriz) en la que o sobre la que las células crecen. Puede estar compuesto por componentes biológicos, componentes sintéticos o una combinación de ambos. Además, puede estar construido de forma natural por células o construido de forma artificial. Además, el armazón puede contener componentes que tienen actividad biológica en condiciones adecuadas.

15 El término “transplante” se refiere a la administración de una composición de un modo indiferenciado, parcialmente diferenciado o completamente diferenciado en un ser humano u otro animal.

Como se usa en el presente documento, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que los componentes, además del agente terapéutico, que comprende la formulación, son adecuados para administrar al paciente que se esté tratando de acuerdo con la presente invención.

20 La expresión “enfermedad hepática”, como se usa en el presente documento, incluye, entre otros, cirrosis hepática, enfermedades metabólicas del hígado, tal como deficiencia de alfa-1-antitripsina y ornitina transcarbamilasa (OTC), hepatitis inducida por ingesta de alcohol, hepatitis crónica, colangitis esclerosante primaria, deficiencia de alfa-1-antitripsina y cáncer hepático. como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad pancreática” puede incluir, entre otros, cáncer pancreática, trastorno por déficit de insulina, tal como la diabetes mellitus dependiente de insulina (de tipo 1) (DM1) y diabetes mellitas no dependiente de insulina (de tipo 2) (DM2), infección por hepatitis C, enfermedades pancreáticas exocrinas y endocrinas. Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad neurológica” se refiere a una enfermedad o afección asociada con cualquier defecto e todo el sistema integrado del tejido nervioso del organismo: la corteza cerebral, el cerebelo, el tálamo, el hipotálamo, el mesencéfalo, la protuberancia, la médula, el tronco encefálico, la médula espinal, los ganglios basales y el sistema nervioso periférico. Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad vascular” se refiere a una enfermedad del sistema vascular humano. Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad cardíaca” o “disfunción cardíaca” se refiere a enfermedades que son el resultado de cualquier alteración en la función de bombeo del corazón. El término “miocardiopatía” se refiere a cualquier enfermedad o disfunción del miocardio (músculo cardíaco) en la que se produce un agrandamiento, engrosamiento y/o rigidez anormal del corazón.

40 Como se usa el presente documento, el término “hepatocitos” se refiere a las células que tienen características de las células epiteliales obtenidas del hígado. Como se usa en el presente documento, la expresión “célula pancreática” se usa para hacer referencia a las células que producen glucagón, insulina, somatostatina y/o polipéptido pancreático (PP). Las células pancreáticas preferidas son positivas para marcadores específicos de células pancreáticas, tales como el factor de transcripción homeobox Nkx-2.2, glucagón, gen 6 de la caja apareada (Pax6), homeobox 1 (PDX1) duodenal pancreática e insulina. Como se usa en el presente documento, la expresión “célula endotelial vascular” se refiere a una célula endotelial que exhibe funciones fisiológicas esenciales características de las células endoteliales vasculares, incluidas la modulación de la vasoreactividad y la provisión de una barrera semipermeable al fluido plasmático y a proteínas. Como se usa en el presente documento, el término “cardiomocito” se refiere a una célula de músculo cardíaco que puede latir espontáneamente o que puede exhibir transitorios de calcio (flujo en concentraciones de calcio intracelulares mensurables mediante pruebas de imagen de calcio). Como se usa en el presente documento, la expresión “células neurales” hace referencia a las células que exhiben funciones esenciales de las neuronas y las células de la glía (astrocitos y oligodendrocitos).

55 Como se usa en el presente documento, el término “tejido” se refiere a una agregación de células especializadas de forma similar unidas en el rendimiento de una función.

Como se usa en el presente documento, la expresión “proteína terapéutica” incluye una amplia gama de proteínas biológicamente activas incluidas, entre otras, factores de crecimiento, enzimas, hormonas, citoquinas, inhibidores de citoquinas, factores de coagulación sanguínea, factores de crecimiento y diferenciación peptídicos.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión “composiciones de células derivadas del amnios agrupadas” se refiere a composiciones de células derivadas del amnios en las que al menos el 50 % y hasta aproximadamente el 95 % de las células forman grupos.

65 Como se usa en el presente documento, el término “esferoide” o “esferoides” significa grupos multicelulares en cultivos de suspensión. Como se usa en el presente documento, el término “yema” o “yemas” significa la segregación de una subpoblación de células en un esferoide en un grupo sobre la superficie del esferoide.

Como se usa en el presente documento, la expresión “células germinales” significa células germinales embrionarias, células germinales adultas y las células a las que dan lugar (es decir oocitos y espermatozoides).

5 El término “transplante”, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de una composición que comprende células que están en forma indiferenciada, parcialmente diferenciada o completamente diferenciada en un ser humano u otro animal.

10 Como se usa en el presente documento, “tratamiento” cubre cualquier tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad o afección en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o afección pero al que todavía no se le ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad o afección, es decir, causar la regresión de la enfermedad o afección. La población de sujetos tratados mediante los procedimientos de la invención incluye sujetos que sufren la enfermedad o afección no deseada, así como sujetos en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.

15 Una “herida” es cualquier alteración, por cualquier causa, de la anatomía normal, pero no limitadas a, lesiones traumáticas tales como lesiones mecánicas, térmicas y por incisión; lesiones programadas, tal como cirugía y hernias quirúrgicas resultantes; heridas agudas, heridas infectadas y heridas estériles, así como heridas asociadas con enfermedades (es decir, úlceras causadas por neuropatía diabética). Una herida es dinámica y el proceso de cicatrización es un continuo que requiere una serie de procesos celulares integrados e interrelacionados que comienzan en el momento de la cicatrización y proceden más allá del cierre inicial de la herida por llegada a una cicatriz estable. Estos procesos celulares están mediados o modulados por sustancias humorales, incluidos, entre otros, citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento y hormonas. De acuerdo con la invención sujeto, “cicatrización de heridas” se refiere a mejorar, mediante alguna forma de intervención, los procesos celulares naturales y las sustancias humorales de modo que la cicatrización es más rápida y/o el área cicatrizada resultante tiene menos cicatriz y/o el área herida posee una resistencia a la tracción tisular que está más cerca a la del tejido no dañado.

Definiciones de términos adicionales se exponen en la tabla de abreviaturas siguientes.

30

**Tabla 1**

<b>Abreviatura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Descripción</b>
A1AT	Alfa-1 antitripsina	IE	Equivalente del islote
CD34	Antígeno 34 de diferenciación agrupado	LeftyA	Preproteína del factor asociado con hemorragia endometrial
c-Kit	Receptor del factor de células madre	MBP	Proteína básica de la mielina
C/EBP $\alpha$	CCAAT/potenciador de la proteína alfa de unión	Nkx 2,2	Factor de transcripción NK2 relacionado, locus 2
CNP	Péptido natriurético C	IE	Equivalente del islote
CYP	Citocromo	Oct-4	Proteína de unión a octámero 3/4
ELISA:	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	Pax	Gen de homeobox apareado
EROD	Etoxirosorufin-o-deetilasa	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EG	Germinal embrionaria	PDX1	Homeobox duodenal pancreática
ES	Célula madre embrionaria	PP	Polipéptido pancreático
FCS	Suero bovino fetal	Rex-1	Expresión reducida 1
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	RIA	Radioinmunoensayo
FACS	Clasificación de células activada por fluorescencia	Rt-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
Foxa2	Proteína A2 de la caja en cabeza de tenedor; factor 3-beta nuclear de hepatocitos	RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
GABA	Ácido gammaaminobutírico	SHh	Sonic Hedgehog
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa	Sox-2	HMG-caja 2 relacionada con SRY
HB9	Proteína HB9 homeobox	SSEA	Antígeno embrionario específico de etapa
HNF4a	Factor 4 $\alpha$ nuclear de hepatocitos	TDGF-1	Factor 1 de crecimiento derivado de teratocarcinoma
HNF6	Factor 6 nuclear de hepatocitos	Thy-1	Antígeno 1 de células del timo; CD90
ICQ	Inmunocitoquímica	TRA 1-60	Antígeno 1-60 relacionado con tumores
IHQ	Inmunohistoquímica	TRA 1-81	Antígeno 1-81 relacionado con tumores
MCI	Masa celular interna	UGT1A1	Uridina bifosfato glucuronosiltransferasa

**Breve descripción de las figuras**

Figura 1: Representación esquemática del desarrollo embrionario humano.

- 5 Figura 2- La aplicación de medios acondicionados supera la inhibición de la cicatrización de heridas causada por bacterias y desvía la trayectoria de la cicatrización en heridas contaminadas de la cicatrización casi normal.

**Descripción detallada**

- 10 De acuerdo con la presente invención se pueden emplear técnicas convencionales de biología molécula, microbiología y de ADN recombinante, dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, ed., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III; Celis, ed., 1994, "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III; Coligan, ed., 1994, "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III; Gait ed., 15 1984, "Oligonucleotide Synthesis"; Hames & Higgins eds., 1985, "Nucleic Acid Hybridization"; Hames & Higgins, eds., 1984, "Transcription And Translation"; Freshney, ed., 1986, "Animal Cell Culture"; IRL Press, 1986, "Immobilized Cells And Enzyme"; Perbal, 1984, "A Practical Guide To Molecular Cloning."

- 20 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de una unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de dicho intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en dicho intervalo indicado, entra dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden incluirse de forma independiente en los intervalos más pequeños y también entran dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o los 25 dos límites incluidos también están incluidos en la invención.

- A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención también se pueden usar procedimientos y materiales similares o 30 equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los procedimientos y materiales preferidos.

- Cabe destacar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. 35

Producción de composiciones de células derivadas del amnios

- 40 Como se ha descrito en el presente documento, las composiciones de células derivadas del amnios se pueden preparar usando las etapas de a) recuperación del amnios de la placenta, b) disociación de las células de la membrana amniótica, c) cultivar las células en un medio basal con la adición de una proteína humana natural o producida de forma recombinante; y, opcionalmente, d) proliferación adicional de las células usando aditivos y/o factores de crecimiento adicionales.

- 45 Recuperación del amnios - La primera etapa en la obtención de las composiciones de células derivadas del amnios de la invención es la recuperación de las células de una placenta. En general, la placenta se procesa lo antes posible tras el parto. En realizaciones preferidas, la placenta se procesa en las cuatro horas posteriores al parto. Si la placenta se refrigera o se extrae el amnios y se refrigera, la recuperación se puede realizar en hasta 36 horas. La placenta usada puede ser placenta a término o pre-término. En la técnica se conocen varios procedimientos usados para obtener células de placenta a término o pre-término (véase, por ejemplo, el documento US 2004/0110287; 50 Anker y col., 2004, Stem Cells 22: 1338-1345; Ramkumar y col., 1995, Am. J. Ob. Gyn. 172:493-500). No obstante, los procedimientos usados en el presente documento proporcionan mejores composiciones y poblaciones de células.

- 55 En condiciones estériles, el amnios se extrae del corion manualmente y se introduce en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) sin aditivos. Preferentemente, esto se realiza a temperatura ambiente. Las membranas se lavan al menos tres veces en HBSS y se lavan después si es necesario para eliminar los coágulos sanguíneos restantes. Todo el tejido que todavía esté muy contaminado con sangre se corta y desecha.

- 60 Disociación de las células de la membrana amniótica - Las membranas se incuban con un reactivo de disociación. Esto se realiza al menos una vez y tantas como diez veces. En algunas realizaciones, el reactivo de disociación es una proteasa. En realizaciones preferidas, la proteasa es Protease XXIII (Sigma; 1mg/ml). En otras realizaciones, los reactivos de disociación incluyen, entre otros: tripsina ± EDTA, PAPAÍNA, ELASTASA, hialuronidasa, colagenasa de tipo I, II, III y IV, ADNasa, PBS sin Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>, EDTA, EGTA, dispasa, colagenasa-dispasa, Tryple (Gibco), colagenasa y dispasa. 65

Caracterización, identificación, aislamiento y creación de poblaciones sustancialmente purificadas de células derivadas del amnios

5 Usando anticuerpos comercialmente disponibles frente a marcadores de células madre conocidos se han caracterizado extensamente las células derivadas del amnios recién aisladas. Como se indica en el Ejemplo 7, las células derivadas del amnios recién aisladas están sustancialmente purificadas con respecto CD90 y CD117. Además, dichas poblaciones son esencialmente negativas para la expresión proteica de CD34, CD44, CD45, CD140b, CD105; esencialmente positivas para la expresión proteica CD9 y CD29; entre aproximadamente un 70-95% positivas para la expresión proteica de SSEA4, CD10, CD166 y CD227; entre aproximadamente un 60-95% positivas para la expresión proteica de HLA-G, EGFR y CD26; y entre aproximadamente un 10-50% positivas para la expresión proteica de CD71.

15 Poblaciones de células derivadas del amnios sustancialmente purificadas se pueden crear usando anticuerpos contra los marcadores proteicos expresados (selección positiva) o no expresados (selección negativa) sobre la superficie celular de las células derivadas del amnios. Por ejemplo, el Ejemplo 8 siguiente demuestra cómo se pueden usar anticuerpos para crear poblaciones sustancialmente purificadas. Estos anticuerpos se pueden usar para identificar, caracterizar, aislar o crear dichas poblaciones sustancialmente purificadas de células derivadas del amnios que expresan dichos marcadores proteicos usando varios procedimientos. Dichos procedimientos pueden implicar una selección positiva, tal como el pase de células de la muestra por una columna que contiene anticuerpos del marcador proteico o mediante la unión de las células a anticuerpos conjugados con perlas magnéticas frente a los marcadores proteicos o mediante panning sobre placas revestidas con anticuerpos del marcador proteico y recolectar las células unidas. Como alternativa, una suspensión de una célula se puede exponer a uno o más anticuerpos marcados con fluorescencia que se unen inmunespecíficamente a los marcadores proteicos de las células derivadas del amnios. Tras la incubación con el anticuerpo o los anticuerpos adecuados, las células derivadas del amnios se lavan en tampón para eliminar cualquier anticuerpo no unido. Las células derivadas del amnios que expresan el o los marcadores proteicos se pueden clasificar mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), por ejemplo un citómetro de flujo Becton Dickinson FACStar. Para crear poblaciones sustancialmente purificadas de las células derivadas del amnios que expresan un(os) marcador(es) proteicos deseados, las células se pueden someter a múltiples rondas de clasificación con FACS.

30 Además, los marcadores proteicos que no se expresan sobre la superficie de las células derivadas del amnios también se pueden usar para identificar, aislar o crear poblaciones de células derivadas del amnios que no expresan dichos marcadores. Dichos procedimientos pueden implicar un procedimiento de selección negativa, tal como el pase de células de la muestra por una columna que contiene anticuerpos del marcador proteico o mediante la unión de las células a anticuerpos conjugados con perlas magnéticas frente a los marcadores proteicos o mediante panning sobre placas revestidas con anticuerpos del marcador proteico y recolectar las células no unidas. Como alternativa, una suspensión de una célula se puede exponer a uno o más anticuerpos marcados con fluorescencia que se unen inmunespecíficamente a los marcadores proteicos. Tras la incubación con el anticuerpo o los anticuerpos adecuados, las células se lavan en tampón para eliminar cualquier anticuerpo no unido. Las células que expresan el o los marcadores proteicos se pueden clasificar mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), por ejemplo un citómetro de flujo Becton Dickinson FACStar y se pueden eliminar estas células. Después se pueden recolectar las células restantes que no se unen a los anticuerpos se pueden recoger. Para crear poblaciones sustancialmente purificadas de células derivadas del amnios que no expresan un(os) marcador(es) proteicos deseados, las células se pueden someter a múltiples rondas de clasificación con FACS como se ha descrito anteriormente.

Poblaciones expandidas de células derivadas del amnios

50 Como se describe en el presente documento, los solicitantes han descubierto un nuevo procedimiento para el aislamiento y la propagación de células pluripotenciales derivadas del amnios. Dichos procedimientos tienen como resultado composiciones derivadas del amnios que se expanden para células pluripotenciales, de modo que proporcionan por primera vez cantidades suficientes de células para permitir el trasplante celular terapéutico. Las composiciones derivadas del amnios expandidas, que se preparan de acuerdo con la invención sujeto, son composiciones en las que el nivel de células multipotenciales por gramo de tejido amniótico es al menos 50 veces y hasta 150 veces más alto tras 5 pases, en comparación con aproximadamente 20 veces más alto usando los procedimientos previos.

60 Adicionalmente, los procedimientos usados par cultivo y proliferación celular proporcionan un medio para cultivar las células, así como otras células pluripotenciales, incluidos, entre otros, células madre embrionarias, en un sistema sin animales. Además, las condiciones de cultivo descritas proporcionan una célula que depende menos de la unión a una superficie de cultivo para su viabilidad, de modo que permite la propagación de las células usando cultivos de suspensión para un escalado eficiente.

65 Las composiciones de células derivadas del amnios expandidas descritas en el presente documento demuestran un potencial de proliferación, expresan ciertos genes que se sabe que solo se expresan en células indiferenciadas (es decir Nanog y Oct-4) y pueden diferenciarse en tipos celulares que normalmente surgen de todas las capas

germinales embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo). Este potencial de diferenciación sugiere que estas células derivadas del amnios expandidas pueden contribuir a diversos tipos celulares. Las composiciones de células derivadas del amnios descritas en el presente documento también son útiles como capas de alimentación para el crecimiento de diversos tipos celulares, incluidas, entre otras, células madre embrionarias (células ES). Las células derivadas del amnios, incluidas las descritas en el presente documento, también producen una amplia variedad de citoquinas y factores de crecimiento, de modo que se preparan las composiciones celulares, el medio acondicionado derivado de las células, los lisados celulares de los mismos, las matrices extracelulares producidas por las células y las combinaciones de las mismas útiles para alcanzar una cicatrización de heridas rápida y eficaz, incluida la cicatrización sin cicatriz, y también son útiles en cosmética, es decir para alcanzar una mejora en el aspecto de la piel.

Cultivo de las células amnióticas - Las células se cultivan en medio basal. Dicho medio incluye, entre otros, Epilife (Cascade Biologicals), Opti-pro, VP-SFM, IMDM, Advanced DMEM, KIO DMEM, 293 SFM II (todos fabricados por Gibco; Invitrogen), HPGM, Pro 293S-CDM, Pro 293A-CDM, UltraMDCK, UltraCulture (todos fabricados por Cambrex), Stemline I y Stemline II (ambos fabricados por Sigma-Aldrich), DMEM, DMEM/F-12, Ham's F12, M199, y otros medios basales comparables. Dichos medios deberán contener proteína humana o estar suplementados con proteína humana. Como se usa en el presente documento, una "proteína humana" es una que se produce de forma natural o una que se produce usando tecnología recombinante. Con "proteína humana" también se pretende incluir un fluido humano o derivado o preparación del mismo, tal como suero humano o fluido amniótico, que contiene proteína humana. En realizaciones preferidas, el medio basal es Stemline I or II, UltraCulture u Opti-pro, o combinaciones de los mismos, y la proteína humana es albúmina humana a una concentración de al menos 0,5 % y hasta 10 %. En realizaciones concretas, la concentración de albúmina humana es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 72 %. La albúmina humana puede proceder de un líquido o una forma desecada (polvo) e incluye, entre otras, albúmina humana recombinante, plasbúmina y plasmanato.

Las células se cultivan usando un sistema que carece de productos animales para evitar la xenocontaminación. En una realización, el medio de cultivo es Stemline I o II, Opti-pro o DMEM, con albúmina humana (plasbúmina) añadida a concentraciones de hasta 10 %. Como alternativa, se puede usar UltraCulture, sustituyendo la transferrina con transferrina recombinante humana y sustitución de la albúmina bovina (BSA) por albúmina humana a concentraciones de hasta 10 %. La invención además contempla el uso de cualquiera de los medios basales anteriores en los que las proteínas derivadas de animales se sustituyen con proteínas humanas recombinantes y suero derivado de animal, como la BSA, se sustituye con albúmina humana. En realizaciones preferidas, el medio carece de suero además de carecer de animales.

Además, las condiciones de cultivo descritas en el presente documento tienen como resultado la formación de grupos tridimensionales de células denominados esferoideos, una propiedad que puede potenciar la probabilidad de diferenciación en, por ejemplo, células de los islotes pancreáticos, linajes neurales y células cardíacas. Dichas composiciones se preparan como se ha descrito anteriormente usando un medio basal seleccionado del grupo constituido por Opti-pro SFM, VP-SFM, iscove's MDM, HPGM, UltraMDCK, Stemline II y Stemline I, DMEM, y DMEM:F12 con adición de albúmina humana, plasmanato o plasbúmina a niveles de hasta el 10 %.

Cuando no se impide el uso de suero no humano, tal como para usos in Vitro, el medio de cultivo se puede suplementar con suero derivado de mamíferos que no sean seres humanos, en intervalos de hasta el 40 %.

Proliferación adicional - Opcionalmente se usan otros factores de proliferación. En una realización se usa el factor de crecimiento epidérmico (EGF) a una concentración de entre 0-1 µg/ml. En una realización preferida, la concentración de EGF es de aproximadamente 10 ng/ml. Factores de crecimiento alternativos que se pueden usar incluyen, entre otros, TGFα o TGFβ (5 ng/ml; intervalo 0,1-100 ng/ml), activina A, coleratoxina (preferentemente a un nivel de aproximadamente 0,1 µg/ml; intervalo 0-10 µg/ml), transferrina (5 µg/ml; intervalo 0,1-100 µg/ml), factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF 40 ng/ml (intervalo 0-200 ng/ml), aFGF, FGF-4, FGF-8; (todos en el intervalo de 0-200 ng/ml), proteínas morfogénicas óseas (es decir, BMP-4) u otros factores de crecimiento que se sabe que potencian la proliferación celular.

Pases - Las células se siembran inicialmente a una densidad de 25.000/cm<sup>2</sup> -1.000.000cm<sup>2</sup>, en placas tratadas de cultivo tisular, preferentemente a una densidad de aproximadamente 130.000/cm<sup>2</sup>. En una realización, las células se cultivan en placas tratadas con matriz extracelular, tal como colágeno, laminina, fibronectina o Matrigel. Para crear las composiciones de células derivadas del amnios expandidas de la invención, las células se pasan al menos cinco (5) veces como se describe más adelante en el Ejemplo 1. Para crear las composiciones de células derivadas del amnios esferoideas de la invención solo se requiere un pase.

Crecimiento de células ES -También se pueden usar los medios de cultivo descritos anteriormente para producir preparaciones expandidas o esferoideas de células madre embrionarias (células ES). En algún caso, el medio de cultivo carece de productos animales. En un caso preferido, el medio de cultivo carece de productos animales y se ha preparado sin suero.

Cultivo a gran escala de células derivadas del amnios - En otro caso, el cultivo a gran escala se usa para producir las composiciones de células derivadas del amnios, medios acondicionados de las mismas y células para la preparación de lisados celulares. La literatura que describe cultivos de células de mamífero a gran escala se ha relacionado principalmente con el cultivo de células, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), para producir proteínas terapéuticas (Moreira, J. L. y col. (1995) *Biotechnol Prog*, 11 :575). En este caso, el producto secretor de las células es el principal producto de interés. Las tecnologías usadas con mayor frecuencia para la producción a gran escala han sido matraces giratorios y frascos rotatorios, aunque los frascos rotatorios están siendo sustituidos en algunas aplicaciones, especialmente en las que cumplen el cultivo celular, por bioreactores de cultivo de fibra hueca y sistemas de bioreactores de microvehículos (Martin, I., y col. (2004) *Trends Biotechnol*, 22:80). Los bioreactores de fibra hueca combinan fibras sintéticas con células de mamífero. Las células se siembran entre las fibras y crecen en una formación similar a un tejido tridimensional. Las fibras actúan como conductos para factores nutricionales y oxígeno para alcanzar las células, y también proporcionan una salida para las toxinas y los subproductos celulares que tienen que eliminarse de la proximidad de las células. Uno de los inconvenientes de la tecnología de fibra hueca es la dificultad en la recuperación de las células, aunque para algunas aplicaciones, tales como los dispositivos de asistencia hepática extracorpórea, las células permanecen in situ para conseguir su fin terapéutico (Gerlach, J. C., (1997) *Cell Bio Toxicol*, 13:349).

El cultivo celular a gran escala se puede usar para cultivar las células derivadas del amnios como producto para algunos fines terapéuticos, incluido el crecimiento de células para trasplante, así como para la producción de medios acondicionados. Las células hematopoyéticas para el trasplante de médula ósea se han cultivado en suspensión (Cheshier, S. H., y col., (1999) *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:3120; Madlambayan, G. J., y col., (2001) *J Hematother Stem Cell Res*, 10:481), hepatocitos para dispositivos de asistencia extracorpórea (Gerlach, J. C., (1997) *Cell Bio Toxicol*, 13:349), queratinocitos para aplicaciones de piel artificial (Zacchi, V., y col., (1998) *J Biomed Mater Res*, 40:187; Pellegrini, G., y col., (1998) *Med Biol Eng Comput*, 36:778; Waymack, P., y col., (2000) *Bums*, 26:609), y células madre neurales para enfermedades neurodegenerativas (Kallos, M. S., y col. (2003) *Med Biol Eng Comput*, 41 :271). Si las células de mamífero son dependientes de anclaje y no se pueden cultivar en suspensión se pueden usar perlas microtransportadoras o microvehículos como área de superficie grande a la que las células se pueden unir y cultivar en el aparato de suspensión. Las perlas microtransportadoras cubiertas por células se mantienen en suspensión en los aparatos usados para los cultivos de suspensión celular, que permite reducciones en el uso de medios y los requisitos de espacio. Una de las dificultades técnicas de los cultivos en perlas microtransportadoras es la eliminación eficiente de las células de las propias perlas sin comprometer la viabilidad (Varani, J., y col. (1986) *J Bio Stand*, 14:331). El procedimiento preferido sería cultivar las células derivadas del amnios en suspensión.

La producción escalable de las células derivadas del amnios se puede conseguir usando sistemas actualmente en desarrollo para células madre embrionarias humanas (hES). La mayoría de los ejemplos de escalado para las células hES incluyen la diferenciación parcial o completa durante el procedimiento de escalado, por ejemplo Gerecht-Nir y colaboradores (Gerecht-Nir, S., y col. (2004) *Biotechnol Bioeng*, 86:493) informan sobre la escalabilidad de las células ES como cuerpos embrioides. Otros ejemplos de escalada diferenciada de células ES incluyen células cardíacas (Zandstra, P. W., y col. (2003) *Tissue Eng*, 9:767) en los que los cuerpos embrioides se forman y tratan con ácido retinoico y se escalan los hepatocitos derivados de ES en biorreactores de fibra hueca (Gerlach, J. C., (1997) *Cell Bio Toxicol*, 13:349). Los informes de escalada de células ES humanas indiferenciadas son escasos, aunque se pueden proliferar las células ES de ratón en biorreactores de fibra hueca, con mantenimiento de sus características de superficie de las células madre.

En otras realizaciones, las células se cultivan en condiciones de cultivo en suspensión, incluidas placas tratadas con cultivos en suspensión y frascos rotatorios (e frascos rotatorios a un intervalo de densidad de 100.000/ml – 5 millones/ml; preferidos es 1 millón/ml) o matraces giratorios con o sin fijación a perlas microtransportadoras. Los Ejemplos 2, 3 y 4 establecen procedimientos de producción a gran escala que se pueden usar de acuerdo con la invención.

Se realizan experimentos para determinar el medio y los suplementos que se pueden usar para un crecimiento óptimo de las células y la expresión de una función diferenciada. El uso de múltiples matraces giratorios permite el uso de 2 o 3 duplicados de cada condición por experimento.

Una vez que las células se cultivan con éxito en suspensión, se cultivan después en cantidades suficientes para trasplante. Un experto en la técnica reconocerá que el número de células necesario para el trasplante dependerá de la aplicación específica. Las células se recolectan según se determine en el primer conjunto de experimentos anteriores, pero en lugar de sembrar en matraces T o matraces giratorios, se introducen en bolsas Wave. Estas son bolsas de plástico estériles (Wave, Inc.) en las que se añaden células y medio. La bolsa y su contenido se introducen en un agitador que agita suavemente toda la bolsa. Además, de un modo continuo se puede añadir CO<sub>2</sub> y aire para mantener un control adecuado del oxígeno y el pH. El intervalo de tamaños de la bolsa es de 1 litro a 1.000 litros. En una realización se usan bolsas de 1 litro y un volumen de trabajo mínimo de 125 ml. A medida que las células crecen se puede usar medio adicional hasta alcanzar el volumen de trabajo de 500 ml.

Las células derivadas del amnios se introducen en las bolsas Wave y en matraces T normales, y se incuban a 37° C

a 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Se extraen muestras diarias de células en una campana de bioseguridad de clase 100, de cada matraz y vaso, y las células se tiñen con azul triptán y se cuentan en un hemocitómetro. Un gráfico o los recuentos de células viables y totales por ml se representan frente al tiempo para garantizar que las células derivadas del amnios se dividen y siguen siendo viables con el tiempo en cultivo.

Las bolsas Wave tienen dos ventajas principales sobre los vasos de cultivo alternativos. En primer lugar, son desechables y, por tanto, no es necesario validar la limpieza para cada lote de células. En segundo lugar, debido a que el movimiento de balanceo crea una onda de líquido en las bolsas, el intercambio de bases en el líquido es mucho mayor que si las células estuvieran en un matraz estático o en un matraz giratorio. Como resultado, el número total de células que se puede conseguir es mayor que en los matraces T o en los matraces giratorios.

A intervalos específicos se analizan las muestras usando PCR con transcriptasa inversa y/o en tiempo real para la expresión génica en el tiempo. Las muestras se analizan para detectar marcadores específicos de las células derivadas del amnios, tales como Oct-4, nanog, etc. Además, las muestras se miden mediante análisis FACS para detectar marcadores de superficie celular de las células indiferenciadas (SSEA-3 y 4, Tra-1-60 y Tra-1-81).

Además, se analiza la capacidad de las células derivadas del amnios tras el cultivo en suspensión y la proliferación para pasar a diferenciación de los tres linajes germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Dicha caracterización de la capacidad de diferenciación se evalúa realizando ensayos de diferenciación y análisis de la expresión génica mediante PCR con transcriptasa inversa y/o en tiempo real, y mediante análisis FACS de volumen bajo (o IHQ).

A intervalos de tiempo designados, las células se retiran de los vasos de cultivo y se cultivan en protocolos de diferenciación para determinar su capacidad para diferenciarse en los tres linajes germinales tras la proliferación.

Composiciones - Las composiciones de la invención incluyen poblaciones sustancialmente purificadas y composiciones farmacéuticas de ellas. Las composiciones de la invención se pueden preparar de diversos modos según el uso previsto de las composiciones. Por ejemplo, una composición útil en la práctica de la invención puede ser un líquido que comprende un agente de la invención, es decir una población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios, en solución, en suspensión o en ambos (solución/suspensión). La expresión "solución/suspensión" se refiere a una composición líquida en la que una primera porción del agente activo está presente en solución y una segunda porción del agente activo está presente en forma particulada, en suspensión en una matriz líquida. Una composición líquida también incluye un gel. La composición líquida puede ser acuosa o estar en forma de ungüento, bálsamo, crema o similar.

Una suspensión acuosa o solución/suspensión útil para practicar los procedimientos de la invención puede contener uno o más polímeros como agentes de suspensión. Polímeros útiles incluyen polímeros hidrosolubles, tales como polímeros de celulosa, y polímeros insolubles, tales como polímeros que contienen carboxilo reticulado. Una suspensión acuosa o solución/suspensión de la presente invención es, preferentemente, viscosa o mucoadhesiva, o, incluso más preferentemente, tanto viscosa como mucoadhesiva.

Composiciones Farmacéuticas - La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas de poblaciones sustancialmente purificadas de células derivadas del amnios y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la composición. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede también contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Y los expertos en la técnica están familiarizados con otros más.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular como formas salinas o neutras. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con los grupos amino libres, tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico etc., y las formadas con los grupos carboxilo libres, tales como los que derivan de sodio, potasio, amoníaco, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína etc.

Kits de tratamiento - La invención también proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica de la invención contenida dentro del material de envasado, en el que la composición farmacéutica comprende una población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios y



en el que material de envasado comprende una etiqueta o ficha técnica que indica que la población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios se puede usar para tratar diversos trastornos incluidos, entre otros, diabetes, enfermedad hepática, enfermedad neural etc.

##### 5 Usos terapéuticos de células derivadas del amnios y de células diferenciadas

10 Dado que estas composiciones comprenden números de células mucho mayores por tejido amniótico de lo que se ha conseguido anteriormente, permiten el uso terapéutico en situaciones, tales como trasplantes, que requieren un gran número de células. Se ha descubierto que estas células son multipotenciales, es decir capaces de diferenciarse en diversos tipos de tejido, incluidos, entre otros, tejidos hematopoyético, hepático, pancreático, nervioso, muscular y endotelial. Dichas células son particularmente útiles para restaurar la función en tejidos enfermos mediante terapia de trasplante o ingeniería tisular, y para estudiar el metabolismo y la toxicidad de compuestos en esfuerzos de descubrimiento de fármacos.

15 Las estrategias de trasplante celular usadas actualmente en la clínica o en ensayos clínicos han demostrado resultados prometedores, por ejemplo 1) actualmente se están transplantando islotes pancreáticos, aislados de tejido de cadáver, para restablecer la secreción adecuada de insulina y aliviar la necesidad de inyecciones de insulina en pacientes diabéticos de tipo I y 2) se transplantan hepatocitos aislados de hígados de cadáver para tratar pacientes que están esperando un trasplante hepático y para el tratamiento de trastornos metabólicos. No obstante, la necesidad de islotes pancreáticos y hepatocitos de calidad clínica supera con mucho el número de células que se pueden aislar y transplantar del tejido donante. Las composiciones de células derivadas del amnios expandidas descritas en el presente documento proporciona una fuente abundante de células que se pueden diferenciar en estos tipos celulares.

25 Las composiciones que comprenden células derivadas del amnios o células diferenciadas de las mismas se pueden administrar a un sujeto para proporcionar varias funciones tisulares o celulares. Como se usa en el presente documento, "sujeto" puede significar un animal humano o no humano.

30 Dichas composiciones se pueden formular de cualquier modo convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que opcionalmente comprenden excipientes y adyuvantes. La formulación adecuada depende de la vía de administración escogida. Las composiciones se pueden envasar con instrucciones escritas para el uso de las células en la regeneración tisular o restablecer una función metabólica terapéuticamente aceptable. Las células derivadas del amnios también se pueden administrar al receptor en uno o más vehículos fisiológicamente aceptables. Los vehículos para estas células pueden incluir, entre otros, soluciones de solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución de Ringer lactato que contiene una mezcla de sales a concentraciones fisiológicas.

40 Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la concentración adecuada de células para un fin concreto. Una dosis preferida está en el intervalo de aproximadamente  $0,25$  a  $1,0 \times 10^6$  células.

45 Las células derivadas del amnios o las células diferenciadas de las mismas se pueden administrar mediante inyección en un sitio diana de un sujeto, preferentemente mediante un dispositivo de liberación, tal como un tubo, por ejemplo un catéter. El tubo puede contener adicionalmente una aguja, por ejemplo una jeringuilla, a través de la cual se pueden introducir las células en el sujeto en una localización deseada. Ejemplos específicos no limitantes de administrar células a sujetos pueden también incluir la administración mediante inyección subcutánea, inyección intramuscular o inyección intravenosa. Si la administración es intravenosa se puede preparar una suspensión líquida inyectable de células y administrar mediante un goteo continuo o en bolo.

50 Las células también se pueden insertar en un dispositivo de liberación, por ejemplo una jeringuilla, en formas diferentes. Por ejemplo, las células se pueden suspender en una solución contenida en dicho dispositivo de liberación. Como se usa en el presente documento, el término "solución" incluye un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que las células de la invención permanecen viables. Vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones de tampón acuoso, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de dichos vehículos y diluyentes es bien conocido en la técnica. La solución es, preferentemente, estéril y fluida en la medida en que existe capacidad para usarse con una jeringuilla. Preferentemente, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos mediante el uso de, por ejemplo, parabenes, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Las soluciones de la invención se pueden preparar incorporando células derivadas del amnios o células diferenciadas tal como de ha descrito en el presente documento en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y, según se requiera, otros ingredientes indicados anteriormente, seguido de esterilización por filtración.

65 Las células derivadas del amnios indiferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas se pueden administrar sistémicamente (p. ej., por vía intravenosa) o localmente (p. ej., directamente en el defecto del miocardio con guía ecocardiográfica o mediante aplicación directa con visualización durante cirugía). Para estas inyecciones, las células pueden estar en una preparación de suspensión líquida inyectable o en un medio

biocompatible que es inyectable en forma de líquido y se convierte en semisólida en el lugar del tejido dañado. Se puede usar una jeringuilla intracardiaca convencional o un dispositivo de liberación endoscópica controlable siempre que la luz o el orificio de la aguja tenga un diámetro suficiente (p. ej., 30 gauge o mayor) para que las fuerzas de cizalladura no dañen las células que se están liberando.

5 Las células se pueden administrar de un modo que se puedan injertar en el punto del tejido previsto y reconstituir o regenerar el área funcionalmente deficiente. Las células derivadas del amnios indiferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas se pueden usar en terapia mediante administración directa o como parte de un dispositivo de bioasistencia que proporcione una función orgánica temporal o permanente. A este respecto, las células derivadas del amnios indiferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas se pueden cultivar en un biorreactor para proporcionar soporte orgánico extracorpóreo para alivio del órgano, tal como en el caso de un dispositivo de asistencia hepática, para proporcionar una fuente abundante de células para trasplante para restablecer la función orgánica o proporcionar una fuente de medios acondicionados que se pueden usar para estimular la regeneración del tejido. Los dispositivos de asistencia hepática usan células porcinas primarias, además se han usado células hepáticas humanas primarias con éxito (Sauer, I.M., y col. Xenotransplantation (2003) 10:460-469; Irgang, M. y col. (2003) 28(2):141-154; Sauer, I.M. y col. (2002) Int. J. Art. Org. 25(10):1001-1006; Sauer, I.M. y col. (2002) J. Metabolic Brain Disease 17(4): 477-484, Sauer, I.M. y col. (2003) J. Hepatology 39(4):649-653). Los hepatocitos derivados de células derivadas del amnios se pueden usar junto con esta tecnología.

20 Como alternativa, las células derivadas del amnios se pueden transplantar en el receptor en el que las células proliferarán y se diferenciarán para formar células y tejidos nuevos, de modo que proporcionan los procesos fisiológicos normalmente proporcionados por dicho tejido o pueden producir factores que producen migración y/o diferenciación de las células en el área del trasplante. Los tejidos se encuentran en agregación de células especializadas de forma similar unidas en el rendimiento de una función concreta. Está previsto que el tejido abarque todos los tipos de tejido biológico, incluidos tejidos duros y blandos. Tejido blando hace referencia a tejidos que conectan, soportan o rodean otras estructuras y órganos del cuerpo. Tejidos blandos incluyen músculos, tendones (bandas de fibras que conectan los músculos a los huesos), tejidos fibrosos, grasa, vasos sanguíneos, nervios y tejidos sinoviales (tejidos alrededor de las articulaciones). Tejido duro incluye el tejido conjuntivo (p. ej., formas duras tales como tejido óseo o hueso), así como otros tejidos musculares o esqueléticos.

25 Matrices de soporte en las que se pueden incorporar o incluir células derivadas del amnios incluye matrices que son compatibles con el receptor y que se degradan en productos que no son dañinos para el receptor. Estas matrices proporcionan soporte y protección para las células derivadas del amnios indiferenciadas y diferenciadas *in vivo* y, por tanto, son la forma preferida en la que dichas células se transplantan a los sujetos receptores.

35 Ejemplos de dichas matrices son matrices biodegradables naturales y/o sintéticas. Las matrices biodegradables naturales incluyen coágulos de plasma, por ejemplo derivados de un mamífero, matrices de colágeno, fibronectina y laminina, El material sintético adecuado para una matriz de trasplante celular debe ser biocompatible para impedir la migración y las complicaciones inmunológicas y deberá poder soportar el crecimiento celular extenso y la función celular diferenciada. También debe ser reabsorbibles, lo que permite una sustitución de tejido completamente natural. La matriz deberá ser configurable en diversas formas y deberá tener la fuerza suficiente para prevenir el colapso tras la implantación. Estudios recientes indican que los polímeros de poliéster biodegradables hechos de ácido poliglicólico cumplen todos estos criterios (Vacanti, y col., J. Ped. Surg. 23:3-9 (1988); Cima, y col., Biotechnol. Bioeng. 38:145 (1991); Vacanti, y col., Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 (1991)). Otras matrices de soporte biodegradables sintéticas incluyen polímeros sintéticos, tales como polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico. Otros ejemplos de polímeros sintéticos y procedimientos de incorporar o incluir células en estas matrices también se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.298.002 y 5.308.701.

40 La unión de las células al polímero se puede potenciar recubriendo los polímeros con compuestos tales como componentes de la membrana basa, agar, agarosa, gelatina, goma arábiga, colágenos de los tipos I, II, III, IV y V, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanos, mezclas de los mismos, y otros materiales conocidos para los expertos en la técnica del cultivo celular. Todos los polímeros para usar en la matriz deben cumplir los parámetros mecánicos y bioquímicos necesarios para proporcionar soporte adecuado para las células con el consiguiente crecimiento y proliferación. Los polímeros se pueden caracterizar con respecto a las propiedades mecánicas, tales como resistencia a la tracción usando un analizador Instron, para el peso molecular del polímero mediante cromatografía de permeación en gel (GPC), la temperatura de transición vítrea mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la estructura del enlace mediante espectroscopia de infrarrojos (IR), con respecto a la toxicología mediante ensayos de detección inicial como ensayos de Ames y ensayos de teratogenicidad *in vitro*, y estudios de implantación en animales para estudios de inmunogenicidad, inflamación, liberación y degradación.

50 Una de las ventajas de una matriz polimérica biodegradable es que los compuestos angiogénicos y otros bioactivos se pueden incorporar directamente en la matriz de soporte de modo que se liberen lentamente a medida que la matriz de soporte se degrada *in vivo*. A medida que la estructura célula-polímero se vasculariza y la estructura se degrada, las células derivadas del amnios se pueden diferenciar según sus características inherentes. Factores, incluidos nutrientes, factores de crecimiento, inductores de diferenciación o desdiferenciación (es decir que hace que

las células diferenciadas pierdan las características de diferenciación y adquieren características tales como proliferación y una función más general), productos de secreción, inmunomoduladores, inhibidores de la inflamación, factores de regresión, compuestos biológicamente activos que potencian o permiten el crecimiento hacia dentro de la red linfática o las fibras nerviosas, ácido hialurónico y fármacos, que los expertos en la técnica conocen y están disponibles comercialmente con instrucciones en lo referente a lo que constituye una cantidad eficaz, de suministradores tales como Collaborative Research, Sigma Chemical Co., factores de crecimiento vascular tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de de crecimiento similar al factor de de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) se pudieron incorporar e la matriz o proporcionarse junto con la matriz. De forma similar, los péptidos que contienen polímeros, tales como el péptido de unión RGD (Arg-Gly-Asp), se pueden sintetizar para usar en la formación de matrices (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4,988,621, 4,792,525, 5,965,997, 4,879,237 y 4,789,734).

En otro ejemplo, las células derivadas del amnios indiferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas se pueden transplantar en una matriz de gel (tal como Gelfoam de Upjohn Company) que se polimeriza para formar un sustrato en el que pueden crecer las células. Se han desarrollado diversas tecnologías de encapsulación (p. ej., Lacy y col., Science 254:1782-84 (1991); Sullivan y col., Science 252:718-712 (1991); documentos WO 91/10470; WO 91/10425; la patente de EE.UU. n° 5,837,234; la patente de EE.UU. n° 5,011,472; la patente de EE.UU. n° 4,892,538). Durante procedimientos quirúrgicos abiertos que implican acceso físico directo al tejido y/u órgano dañado, todas las formas descritas de las preparaciones de liberación de células derivadas del amnios indiferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas son opciones disponibles. Estas células se pueden trasplantar repetidamente a intervalos hasta que se alcance un efecto terapéutico deseado.

En el presente documento se describe el uso de células derivadas del amnios en sistemas tridimensionales de cultivo tisular y celular para formar estructuras análogas a las homólogas de los tejidos *in vivo*. El tejido resultante sobrevivirá durante periodos de tiempo prolongados y realizará funciones específicas de tejido tras el trasplante en el huésped receptor. En las patentes de EE.UU. N° 5,624,840 y 6,428,802 se describen procedimientos de producir dichas estructuras.

Las matrices tridimensionales que se van a usar son matrices estructurales que proporcionan un armazón para las células, para guiar el proceso de formación de tejido. Los armazones pueden tomar formas que varían de fibras, geles, tejidos, láminas similares a esponjas y estructuras 3D complejas, con poros y canales fabricados usando abordajes complejos de Fabricación de Formas Sólidas Libres (SFFF). Las células cultivadas en una matriz tridimensional crecerán en múltiples capas para desarrollar estructuras organotípicas que se producen en tres dimensiones, como conductos, placas y espacios entre placas que simulan áreas sinuosidades, formando de este modo nuevo tejido hepático. Por tanto, en un caso se proporciona un armazón, una célula multicapas y un sistema de cultivo tisular. Como usa en el presente documento, el término "armazón" significa una estructura tridimensional (3D) (sustrato y/o matriz) en la que o sobre la que las células crecen. Puede estar compuesto por componentes biológicos, componentes sintéticos o una combinación de ambos. Además, puede estar construido de forma natural por células o construido de forma artificial. Además, el armazón puede contener componentes que tienen actividad biológica en condiciones adecuadas. La estructura del armazón puede incluir una malla, una esponja o puede estar formado por un hidromel.

Ejemplos de dicho armazón incluyen tejido estromal tridimensional o matriz estromal viva en la que se han inoculado células estromales que se cultivan en un soporte tridimensional. Las proteínas de la matriz extracelular elaboradas por las células estromales se depositan sobre el armazón, formando de este modo tejido estromal vivo. El tejido estromal vivo puede soportar el crecimiento de células derivadas del amnios o de células diferenciadas que más tarde se inoculan para formar el cultivo celular tridimensional. Ejemplos de otros armazones tridimensionales se describen en la patente de EE.UU. N° 6,372,494.

El diseño y la construcción del armazón para formar una matriz tridimensional es de gran importancia. La matriz deberá ser un molde poroso inyectable no tóxico y flexible para crecimiento vascular hacia el interior. Los poros permitirán el crecimiento vascular hacia el interior. En general, estos son poros interconectados en el intervalo de entre aproximadamente 100 y 300 micrómetros, es decir que tiene un espacio intersticial entre 100 y 300 micrómetros, aunque se pueden usar aberturas más grandes. La matriz se deberá conformar para maximizar el área de superficie, para permitir la difusión adecuada de nutrientes, gases y factores de crecimiento de las células en el interior de la matriz y para permitir el crecimiento hacia el interior de nuevos vasos sanguíneos y de tejido conjuntivo. En la actualidad se prefiere una estructura porosa que sea relativamente resistente a la compresión, aunque se ha demostrado que incluso si se comprimen uno o dos de los normalmente seis lados de la matriz, dicha matriz sigue siendo eficaz para obtener crecimiento tisular.

La matriz polimérica puede ser flexible o rígida, en función de la forma, estructura y función finales deseadas. Para la reparación de un defecto, por ejemplo, una matriz fibrosa flexible se corta para acercar el defecto completo, después se ajusta al defecto preparado quirúrgicamente según sea necesario durante la implantación. Una ventaja de usar las matrices fibrosas es la facilidad de volver a conformarse y reorganizar las estructuras en el momento de la implantación.

También se puede usar una estructura similar a una esponja para crear una estructura tridimensional. La estructura deberá ser una esponja de celda abierta, una que contiene vacíos interconectados con la superficie de la estructura, para permitir superficies de unión adecuadas para que suficientes células derivadas del amnios o células diferenciadas formen un implante funcional viable.

5 También se describe la liberación de células derivadas del amnios, incluidas composiciones de células derivadas del amnios descritas en el presente documento, junto con cualquiera de las anteriores matrices de soporte así como membranas derivadas del amnios. Dichas membranas se pueden obtener como subproducto del proceso descrito en el presente documento para la recuperación de células derivadas del amnios, o mediante otros procedimientos, 10 tales como los descritos en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6,326,019 que describe un procedimiento para fabricar, almacenar y usar un injerto quirúrgico de membrana amniótica humana, el documento , US 2003/0235580 que describe membranas amnióticas reconstituidas y recombinantes para la liberación sostenida de moléculas terapéuticas, proteínas de metabolitos, en un huésped; el documento U.S. 2004/0181240 que describe una membrana amniótica que cubre una superficie de tejido que puede prevenir adherencias, excluir bacterias o inhibir la actividad bacteriana, o para estimular la cicatrización o crecimiento de tejido, y la patente de EE.UU. N° 4,361,552, 15 que atañe a la preparación de membranas amnióticas reticuladas y su uso en procedimientos para tratar raspados y heridas. Las células derivadas del amnios se pueden cultivar en dichas membranas, añadir a la membrana en forma indiferenciada, parcialmente diferenciada o completamente diferenciada o a dichas membranas se pueden añadir medio acondicionado de células derivadas del amnios o lisados celulares. Como alternativa, el tejido amniótico en el 20 que no se han retirado las células derivadas del amnios se puede usar para liberar células derivadas del amnios en un punto concreto. En todos los casos, las células derivadas del amnios usadas junto con tejido amniótico u otras matrices se pueden usar en combinación con otras células terapéuticamente útiles y/o células que expresan terapéuticas biológicamente activas, tales como las descritas más adelante.

25 Las células derivadas del amnios y las células diferenciadas de las mismas también se pueden usar para humanizar órganos animales. Las células derivadas del amnios humanas pueden transplantarse de forma similar en otro órgano, como el páncreas o el cerebro o el corazón. En el órgano animal puede o no haberse eliminado sus células nativas antes del trasplante. Órganos "humanizados" de un animal como un ratón, rata, mono, cerdo o perro podrían ser útiles para trasplantes de órganos en seres humanos con enfermedades específicas.

30 Los modelos animales humanizados también se pueden usar con fines diagnósticos o de investigación en relación con, entre otros, el metabolismo de fármacos, estudios toxicológicos o para la producción, estudio o replicación de organismos víricos o bacterianos. Actualmente se están usando ratones transplantados con hepatocitos humanos que forman hígados humanos quiméricos para el estudio de virus hepáticos (Dandri y col., Hepatol. 33:981-988 35 (2001); Mercer y col., Nature Med. 7:927-933 (2001)).

Las células derivadas del amnios pueden someterse a ingeniería genética para producir una proteína terapéutica concreta. La proteína terapéutica incluye una amplia gama de proteínas biológicamente activas incluidas, entre 40 otras, factores de crecimiento, enzimas, hormonas, citoquinas, inhibidores de citoquinas, factores de coagulación sanguínea, factores de crecimiento y diferenciación peptídicos. Células diferenciadas concretas se pueden someter a ingeniería genética con una proteína que normalmente es expresada por el tipo celular concreto. Por ejemplo, las células pancreáticas se pueden someter a ingeniería genética para producir enzimas digestivas. Los hepatocitos se pueden someter a ingeniería genética para producir la enzima inhibidora A1AT, o factores de coagulación para tratar la hemofilia. Además, las células neurales se pueden someter a ingeniería genética para producir transmisores 45 químicos.

Se pueden usar procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan un ácido nucleico que codifica la proteína de interés unida a las señales de control de la transcripción/traducción adecuadas. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, ed., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III; Celis, ed., 50 1994.

Procedimientos adecuados para transferir vectores o plásmidos a células derivadas del amnios o células diferenciadas de las mismas incluyen complejos de lípidos/ADN, como los descritos en las patentes de EE.UU. n° 55 5,578,475; 5,627,175; 5,705,308; 5,744,335; 5,976,567; 6,020,202; y 6,051,429. Reactivos adecuados incluyen lipofectamina, una formulación liposómica 3:1 (p/p) del lípido policationico 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino trifluoroacetato (DOSPA) (Nombre en el Registro de Resúmenes Químicos: N-[2-(2,5-bis[(3-aminopropil)amino]-1-oxpentil)amino)etil]-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxi)-1-propanamin-trifluoroacetato), y el lípido neutro dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) en agua filtrada por membrana. Ejemplo es la formulación de Lipofectamine 2000™ (disponible en Gibco/Life Technologies # 11668019). Otros reactivos incluyen: FuGENE™ 6 reactivo de transfección (mezcla de lípidos e forma o liposómica y 60 otros compuestos en etanol al 80 %, que se pueden obtener en Roche Diagnostics Corp. # 1814443); y LipoTAXI™ reactivo de transfección (formulación lipídica de Invitrogen Corp., #204110). La transfección de células derivadas del amnios se puede realizar mediante electroporación, por ejemplo como describen Roach y McNeish (Methods in Mol. Biol. 185:1 (2002)). Sistemas de vectores víricos adecuados para producir células madre con alteraciones genéticas estables se pueden basar en adenovirus, lentivirus, retrovirus y otros virus, y se pueden preparar usando 65

componentes víricos disponibles comercialmente.

Las células derivadas del amnios que están indiferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas se pueden administrar o transplantar a un sujeto para proporcionar varias funciones tisulares o celulares específicas del tipo celular diferenciado.

En el presente documento también se describe la administración de células neurales derivadas de células derivadas del amnios para el tratamiento de enfermedades neurológicas. Enfermedad neurológica se refiere a una enfermedad o afección asociada con cualquier defecto de todo el sistema integrado del tejido nervioso del organismo: la corteza cerebral, el cerebelo, el tálamo, el hipotálamo, el mesencéfalo, la protuberancia, la médula, el tronco encefálico, la médula espinal, los ganglios basales y el sistema nervioso periférico. Ejemplos incluyen, entre otros: enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig), distrofia muscular, síndrome de corea, síndrome distónico, ictus y parálisis.

Las células derivadas del amnios se pueden usar en procedimientos de cebado *in vitro* que tienen como resultado la diferenciación de las células madre neurales en neuronas cuando se injertan en áreas no neurogénicas o neurogénicas del SNC. Para detalles y ejemplos, véase los documentos US2003/0235563 y US2004/0161419.

Las células derivadas del amnios se pueden usar para producir células endoteliales vasculares que se pueden usar en procedimientos para remodelado tisular o de sustitución de un tejido cicatricial en un sujeto. Las células endoteliales vasculares también se pueden usar para reparar daños vasculares.

En una realización de ejemplo, una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de las células endoteliales vasculares se puede usar para tratar a un sujeto con una enfermedad vascular. La enfermedad vascular se refiere a una enfermedad del sistema vascular humano. Ejemplos incluyen arteriopatía periférica, aneurisma aórtico abdominal, enfermedad de las carótidas y enfermedad venosa.

También se describen cardiomiocitos derivados de células derivadas del amnios, que se pueden usar terapéuticamente para el tratamiento de varias enfermedades asociadas con disfunción cardíaca. La enfermedad cardíaca o la disfunción cardíaca, como se usan en el presente documento, se refieren a enfermedades que son el resultado de cualquier alteración en la función de bombeo del corazón. Esto incluye, por ejemplo, alteraciones en la contractilidad, alteraciones en la capacidad para relajarse (en ocasiones se denomina disfunción diastólica), funcionamiento anormal o inadecuado de las válvulas del corazón, enfermedades del músculo cardíaco (en ocasiones denominadas miocardiopatías), enfermedades tales como angina e isquemia miocárdica e infarto caracterizados por una inadecuada irrigación sanguínea del músculo cardíaco, enfermedades infiltrativas tales como amiloidosis y hemocromatosis, hipertrofia global o regional (tal como se puede producir en algunos tipos de miocardiopatía o hipertensión sistémica) y comunicaciones anormales entre las cámaras del corazón (por ejemplo, defecto del tabique entre aurículas). Para un debate adicional, véase Braunwald, Heart Disease: a Textbook of Cardiovascular Medicine, 5ª edición, W B Saunders Company, Philadelphia Pa. (1997) (en lo sucesivo en el presente documento Braunwald). Miocardiopatía se refiere a cualquier enfermedad o disfunción del miocardio (músculo cardíaco) en la que se produce un agrandamiento, engrosamiento y/o rigidez anormal del corazón. Como resultado, normalmente la capacidad del músculo cardíaco para bombear sangre se debilita. La enfermedad o trastorno puede ser, por ejemplo, inflamatoria, metabólica, tóxica, infiltrativa, fibroblástica, hematológica, genética o de origen desconocido. Existen dos tipos generales de miocardiopatías: Isquémica (resultante de la falta de oxígeno) y no isquémica. Otras enfermedades incluyen cardiopatías congénitas, que es un problema relacionado con el corazón que está presente desde el nacimiento y a menudo cuando se está formando el corazón, incluso antes del nacimiento, o enfermedades que se deben a lesiones miocárdicas que implican daños en el músculo o el miocardio en la pared del corazón como resultado de enfermedad o traumatismo. La lesión miocárdica se puede atribuir a muchas cosas, tales como, entre otras, miocardiopatía, infarto de miocardio o cardiopatía congénita.

Las células derivadas del amnios y/o los cardiomiocitos diferenciados se pueden administrar y/o transplantar en un sujeto que sufre una enfermedad cardíaca de cualquiera de los modos anteriormente tratados.

También se proporcionan procedimientos para la detección selectiva de agentes que afectan a la diferenciación o la función de los cardiomiocitos. Para detalles y ejemplos, véase los documentos US2003/0235563 y US2004/0161419.

Las células derivadas del amnios y sus derivados se pueden usar para la detección selectiva de varios compuestos para determinar el efecto del compuesto sobre el crecimiento, la proliferación o la diferenciación celular. Los procedimientos de medir la proliferación celular son bien conocidos en la técnica y con mayor frecuencia incluyen determinar la síntesis de ADN característica de la replicación celular. En la técnica existen numerosos procedimientos para medir la síntesis del ADN, cualquiera de los cuales puede usarse de acuerdo con la invención.

Por ejemplo, la síntesis de ADN se puede determinar usando un marcador radioactivo (<sup>3</sup>H-timidina) o análogos nucleotídicos marcados (BrdU) para la detección mediante inmunofluorescencia. La eficacia del compuesto se puede evaluar generando curvas de respuesta a la dosis a partir de datos obtenidos usando diversas

concentraciones del compuesto. También se puede realizar un ensayo control para proporcionar un valor basal para comparación. La identificación de la o las poblaciones de células derivadas del amnios amplificadas en respuesta a un agente de ensayo dado se puede llevar a cabo de acuerdo al fenotipaje que se ha descrito anteriormente.

5 Con el fin de evaluar el efecto de un agente de ensayo sobre la diferenciación o la función de células derivadas del amnios, el agente se puede poner en contacto con las células derivadas del amnios y se puede evaluar la diferenciación usando cualquier medio conocido para un experto en la técnica. Para ejemplos y detalles, veáanse los documentos US2003/0235563 y US20041 0161419.

10 Las composiciones derivadas del amnios preparadas como se ha descrito en el presente documento se pueden usar como capas de alimentación para el crecimiento de células madre embrionarias. Preferentemente, dichas composiciones derivadas del amnios carecen de animales. Ejemplos de uso de dichas células como capas de alimentación se pueden encontrar en Miyamoto, K., y col., Stem Cells 2004:22:433-440

15 Cicatrización de heridas - Las composiciones y procedimientos de la presente invención son eficaces en la aceleración de la cicatrización de heridas causadas por numerosas fuentes, incluidas, entre otras, lesiones por incisión, por compresión, térmicas, agudas, crónicas, infectadas y estériles. La presente invención se basa en el descubrimiento de que células derivadas de amnios indiferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas, medio acondicionado a partir de ellas, lisados celulares de ellas, matrices extracelulares de ellas, solos o en combinación, así como composiciones de células derivadas de la placenta como se ha definido en el presente documento pueden acelerar el proceso de cicatrización de heridas para todos los tipos de heridas, en particular cuando se administran por vía tópica, es decir en la superficie del sitio de la herida. Usando células derivadas de amnios y/o medio acondicionado de dichas células derivadas de amnios, todos los tipos de herida, mecánicas o térmicas, agudas o crónicas, infectadas o estériles, experimentan cicatrización más rápidamente que  
 20 heridas similares que se han dejado cicatrizar de forma natural o que se han tratado con procedimientos disponibles actualmente. El médico de atención o el veterinario determinará una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una gente terapéutico dentro del significado de la presente invención. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente dichas cantidades y permitirá acelerar la cicatrización de heridas cuando se administra de acuerdo con la presente invención. Los factores que influyen sobre cuál será la cantidad terapéuticamente eficaz, la actividad específica del agente terapéutico que se esté usando, el tipo de herida (mecánica o térmica, de grosor completo o parcial etc.), el tamaño de la herida, la profundidad de la herida (si es de grosor completo), la ausencia o presencia de infección, el tiempo transcurrido desde que se infligió la herida y la edad, el estado físico, la existencia de otras enfermedades y el estado nutricional del paciente. Además, otros medicamentos que el paciente pueda estar recibiendo afectará a la determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico que se va a  
 25 administrar.

Además, las composiciones de la invención pueden desempeñar un papel en una cicatrización de heridas más sustancial, tal como en la regeneración de las extremidades. El documento US2003/0212024 indica procedimientos para analizar dicha capacidad para medir la regeneración en el pez cebra, que es capaz de realizar una  
 40 regeneración completa tras la amputación de la aleta distal. Tras la amputación se produce regeneración completa en varias etapas, incluida la formación de una epidermis de herida, migración de fibroblastos y escleroblastos (u osteoblastos) hacia la epidermis de la herida, formación de un blastema y sobrecrecimiento en el blastema mediante la división y diferenciación celular de la porción proximal de la aleta para formar estructuras específicas de la aleta regenerada.

45 Preferentemente, las células derivadas de amnios y/o el medio acondicionado de las mismas y/o los lisados celulares de las mismas se deben aplicar tópicamente en el lugar de la herida para estimular la aceleración de la cicatrización de heridas en el paciente. Esta administración tópica puede ser una única dosis o varias dosis administradas a múltiples intervalos designados. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que el régimen de dosificación preferido variará con el tipo y gravedad de la lesión que esté siendo tratada.  
 50

Las formulaciones adecuadas para administración tópica de acuerdo con la presente invención comprenden cantidades terapéuticamente eficaces del agente terapéutico con uno o más vehículos y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Las células derivadas de amnios, el medio acondicionado de las mismas y los  
 55 lisados celulares de las mismas se pueden usar junto con diversos materiales de uso habitual en el tratamiento de heridas, tales como cremas basadas en colágeno, películas, microcápsulas o polvos; ácido hialurónico u otras preparaciones derivadas de glucosaminoglucanos; cremas, espumas, material de sutura y apósitos para heridas. Como alternativa, las composiciones celulares derivadas del amnios se pueden incorporar en una solución farmacéuticamente aceptable diseñada para administración tópica.

60 Aplicaciones cosméticas - Las mismas propiedades que hacen células derivadas del amnios indiferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas, medio acondicionado de las mismas, lisados celulares de las mismas, matrices extracelulares de las mismas, solas o en combinación, así como composiciones de células derivadas de la placenta como se ha definido en el presente documento útiles para la cicatrización de heridas las convierten en adecuadas de forma similar para el tratamiento de afecciones cosméticas y/o dermatológicas, incluida  
 65 la piel en envejecimiento. La capa dérmica de la piel, importante en el mantenimiento de la elasticidad y aspecto de

la piel, adelgazamiento con la edad, que conducen a flacidez y arrugas.

Como se ha descrito anteriormente, la piel del feto tiene mecanismos de reparación mucho más eficaces y, una vez herida, puede curar sin la formación de cicatrices. Esta capacidad parece requerir el sistema inmunitario fetal, suero fetal o líquido amniótico (Bleacher J C, y col., J Pediatr Surg 28: 1312-4, 1993); Ihara S, Motobayashi Y., Development 114:573-82. 1992). Dichas capacidades del tejido fetal condujeron al uso sugerido de compuestos producidos por tejido fetal para regenerar y/o mejorar el aspecto de la piel (véase, por ejemplo, el documento US 2004/0170615).

10 También se contempla el uso de las composiciones celulares derivadas del amnios descritas en el presente documento, así como medio acondicionado de las mismas y lisados celulares de las mismas en el uso de nuevas composiciones cosméticas de cuidados de la piel. Dichos compuestos se pueden liberar en la piel a modo de, entre otros, una solución, una loción, un ungüento, una crema, un gel o una tira pelable para la piel.

15 En general, los procedimientos incluyen la etapa de aplicar tópicamente en la piel de un mamífero que lo necesite una cantidad segura y eficaz de la composición. En dichas composiciones se pueden incluir componentes adicionales para los cuidados de la piel, sí como vehículos cosméticamente aceptables, dermatológicamente aceptables o farmacéuticamente aceptables.

20 Normalmente, las composiciones cosméticas comprenden una fase acuosa que gelifica, es decir se espesa, usando uno o más espesantes o agentes de gelificación.

25 Estas pueden ser, por ejemplo, lociones que son soluciones acuosas que no contienen una fase oleosa o emulsiones que pueden ser emulsiones directas de aceite en agua, que incluyen una fase grasa o fase oleosa dispersa en una fase acuosa continua, o emulsiones inversas de agua en aceite que incluyen una fase acuosa dispersa en una fase oleosa continua. El término "emulsión" significa, en el presente documento, las dispersiones obtenidas en ausencia de tensioactivos de emulsificación y las emulsiones obtenidas en presencia de tensioactivos de emulsificación.

30 Las emulsiones de aceite en agua son las emulsiones que con mayor frecuencia se buscan en cosmética debido al hecho de que, cuando se aplican en la piel, proporcionan una sensación más suave, menos grasa y más ligera que los sistemas de emulsión de agua en aceite, en virtud de la presencia de agua en la fase externa continua.

35 La naturaleza de los compuestos usados para melificar la fase acuosa y su contenido en la composición se escogen como una función del tipo deseado de textura, que puede variar desde lociones fluidas a emulsiones más o menos espesas que pueden constituir leches o cremas. Los principales espesantes o agentes gelificantes usados en la cosmética se escogen a parte de los compuestos siguientes de polímeros naturales tales como goma xantana y goma guar o derivados de celulosa, almidones y alginatos, y agentes de gelificación poliméricos reticulados tales como los carbopoles o polímeros de 2-acrilamido-2-ethylpropanosulfónicos reticulados y al menos parcialmente neutralizados.

45 Pérdida de audición- Las células derivadas del amnios indiferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas, medio acondicionado de las mismas, lisados celulares de las mismas, matrices extracelulares de las mismas, solas o en combinación, así como composiciones de células derivadas de la placenta como se definen en el presente documento se pueden usar para tratar la pérdida de audición. Hasta ahora, la pérdida de audición se ha considerado incurable porque las células pilosas, que son las células sensoriales de la cóclea, no se regeneran. No obstante, recientemente, se ha demostrado que las células embrionarias y madre adultas son capaces de diferenciarse en células pilosas mecanosensoriales (Li, H. y col. Nature Med. 9:1293-1299 (2003); Li, H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 100: 13495-13500). Además, se ha usado la terapia génica con Atoh1 para estimular la transgeneración fenotípica, de modo que se estimula la generación de células pilosas a partir de células no sensoriales en mamíferos sordos (Izumikawa, M. y col. 2005 Nature Medicine 11 (3):271-276). Además, se ha demostrado las células epiteliales amnióticas humanas transplantadas en el oído interno de cobayas sobreviven durante hasta tres semanas y expresan proteínas cruciales que pueden mantener la homeostasia (Yuge, I. y col., (2004):77(9)1452-1471).

55 Procedimientos de diferenciación de células derivadas del amnios y tipos celulares diferenciados

60 Las células derivadas del amnios se pueden poner en contacto con diversos factores de crecimiento (que se denominan factores de diferenciación) que influyen sobre la diferenciación de estas células madre en tipos celulares concretos, tales como hepatocitos, células pancreáticas, células endoteliales vasculares, células musculares, cardiomiocitos y células neurales. Para ejemplos, véase los documentos US2003/0235563 y US2004/0161419).

65 La literatura está repleta de protocolos de diferenciación adicionales para células embrionarias, no embrionarias u otras células multipotenciales, como las células madre. Por ejemplo, en las patentes de EE.UU. números 6,607,720 y 6,534,052 se han descrito procedimientos de mejorar la función cardíaca usando células madre embrionarias y células madre embrionarias alteradas genéticamente en las que se ha iniciado la diferenciación, para mejorar la

función cardíaca y reparar el tejido cardíaco. La patente de EE.UU. nº 6,387,369 proporciona procedimientos de regeneración del tejido cardíaco y muscular usando células madre mesenquimatosas. Shin, S. y col. han informado recientemente sobre la diferenciación de células madre embrionarias en neuronas motoras usando una combinación de factor de crecimiento de fibroblastos, proteína sonic hedgehog y ácido retinoico. (Human motor neuron differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2005 Jun; 14(3)-.266-9). Un experto en la técnica reconocerá que cualquiera de estos protocolos se puede aplicar a las composiciones de células derivadas del amnios descritas en el presente documento para producir células parcialmente o completamente diferenciadas para dichos usos. Otros protocolos de ejemplo se indican a continuación:

10 Endodermo (diferenciación pancreática). Las células derivadas del amnios se exponen a condiciones para diferenciación de una población de células progenitoras del islote que expresan PDX1. Brevemente, las células se exponen inicialmente a antagonistas de la vía de señalización Sonic Hedgehog (SHh) para estimular la diferenciación del endodermo. La posterior diferenciación en células tempranas progenitoras del islote se consigue usando una combinación de factores y condiciones que estimulan el cese del crecimiento celular, agregación de las células en diferenciación y expresión de genes tempranos de determinación pancreática. Las células se recogen para obtener el ARN y se analizan mediante PCR-transcriptasa inversa (RT-PCR) para Sox-17 y PDX1.

15 Mesodermo (diferenciación cardíaca). Grupos de células tomadas de los cultivos de suspensión se transfieren a placas recubiertas con gelatina o poli-L-lisina durante 8 días en medio de cultivo con suero (80 % de KD-DMEM, glutamina 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM, 1 % de aminoácidos no esenciales y 20 % de FBS). Durante los días 2-4 en este cultivo, al medio se añaden 1 o 10  $\mu$ M de 5-aza<sup>2'</sup>-desoxicitidina (Xu, C. y col. (2002) *Circ. Res.* 91 :501-508). El análisis se realiza el día 8. Las células se recolectan para detectar ARN y se analizan mediante PCR-transcriptasa inversa (RT-PCR) para GATA-4, Nkx2.5 y MEF-2. Estos factores de transcripción se expresan en el mesodermo precardiaco y persisten durante el desarrollo cardíaco.

25 Ectodermo (diferenciación neural). Los grupos se eliminan del aparato a gran escala y se transfieren placas de 6 pocillos de adherencia ultrabaja. El protocolo de diferenciación descrito procedimiento descrito por Carpenter, M.K. y col., (2001) *Exp Neurol* 172: 383-397 para las células madre embrionarias humanas es seguido para la diferenciación del siguiente modo. Al medio de cultivo 80 % de KD-DMEM, glutamina 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM, 1 % de aminoácidos no esenciales y 20 % de FBS). que contienen estos grupos en suspensión.

30 Tras 4 días en suspensión, los grupos se siembran en placas revestidas con poli-L-lisina/fibronectina en medio de diferenciación (DMEM/F-12 con B27 (Gibco), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano (hEG F), 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (hbFGF) (Gibco), 1 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas humano-AA (hPDGP-AA) (R & D Systems), y 1 ng/ml de factor de crecimiento 1 similar a la insulina (hIGF-1) (R & D Systems) durante 3 días. Tras 3 días en estas condiciones, se recogen las células para obtener el ARN y se fijan. Las células fijadas se han sometido a inmunotinción para nestina, molécula de adhesión celular neural polisialilada (PS-NCAM) y A2B5 . El ARN se analiza mediante PCR-transcriptasa inversa (RT-PCR) para nestina, GFAP y MAP-2.

35 Las células diferenciadas derivadas de células derivadas del amnios se pueden detectar y/o enriquecer mediante la detección de marcadores específicos del tejido mediante técnicas inmunológicas, tales como inmunocitoquímica de flujo para marcadores de la superficie celular, inmunohistoquímica (por ejemplo de células, secciones fijadas de células o tejido) para marcadores intracelulares o de superficie celular, transferencia de tipo Western y el inmunoensayo unido a enzima, para extractos celulares o productos secretados al medio. La expresión de productos génicos específicos de tejido también se puede detectar a nivel de ARN mediante análisis de Northern, análisis de hibridación transferencia-puntos o mediante reacción en cadena de la polimerasa iniciada por la transcriptasa inversa (RT-PCR) usando cebadores específicos de secuencia en procedimientos de amplificación estándar.

40 Como alternativa, las células diferenciadas se pueden detectar usando marcadores de selección, Por ejemplo, las células derivadas del amnios pueden transfeccionarse de forma estable con un marcador que esté bajo el control de una región reguladora específica de tejido como ejemplo, de modo que, durante la diferenciación, el marcador se exprese de forma selectiva en las células específicas y se permita la selección de las células específicas respecto a las células que no expresen el marcador. El marcador puede ser, por ejemplo, una proteína de superficie celular u otro marcador detectable o un marcador que pueda hacer que las células sean resistentes a condiciones en las que mueren en ausencia del marcador, tal como un gen de resistencia a antibiótico (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº . 6.015.671).

### 60 Ejemplos

Los ejemplos siguientes se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo los procedimientos y composiciones de la invención se efectúan y usan, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero se permiten algunos errores y desviaciones del experimento. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es en peso molecular medio, la temperatura está en °C y la presión es la atmosférica o cercana a



ella.

### Ejemplo 1: Preparación de composiciones de células derivadas del amnios

- 5 Recuperación de células derivadas del amnios - Las células derivadas del amnios se disociaron de la membrana amniótica de partida usando los agentes de disociación PXXIII y tripsina. El intervalo del peso medio de un amnios fue 18-27 g. El número de células recuperadas por g de amnios fue de aproximadamente  $10\text{-}15 \times 10^6$  para la disociación con PXXIII y de  $5\text{-}8 \times 10^6$  para la disociación con tripsina.
- 10 Condiciones del cultivo - Las células derivadas del amnios primarias se cultivaron para 5 pases en el medio siguiente: Stemline 11+ 10% de FBS, Stemline 11+ 10% de plasbumina (pb), Ultraculture + 10% de plasbumina (pb), y DMEM + 10% de FBS. Cada condición de cultivo se analizó usando 15 millones de células/g de amnios, 10 millones de células/g de amnios y 5 millones de células/g de amnios, según la enzima usada para la recuperación de las células primarias. Por ejemplo, usando PXXIII se obtuvieron 15 millones de células/g de amnios, mientras que usando tripsina se obtuvieron 10 millones de células/g de amnios, mientras que otras enzimas dieron lugar a menor recuperación (5 millones de células/g de amnios.)
- 15 Pases - Las células se pasaron 5 veces del siguiente modo: Las células se cultivaron unidas a un matraz de cultivo (en plástico tratado para cultivo tisular). Se dejó que las células se dividieran y crecieran. Las células se extrajeron del plástico usando "tryple" (Gibco), un producto similar a la tripsina que es de grado GMP sin animales. Una vez que se han desunido, se centrifugaron las células y el sedimento celular eliminado y resuspendido en el medio de cultivo con proteínas y aditivos (10 ng/ml de EGF) y se volvió a sembrar en matraces frescos. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.
- 20 Resultados. Los resultados se muestran en la Tabla 1 que se expone a continuación. Los datos se expresan como células derivadas del amnios  $\times 10^6$  /gramo de amnios.
- 25

Tabla 1

Eficiencia del aislamiento inicial	5mil/g	10 mil/g	15 mil/g
Stemline + 10% pb	1363	2726	4089
Stemline + 10% FBS	1024	2048	3072
Ultraculture + 10% pb	575	1151	1726
DMEM + 10% FBS	128	256	384
DMEM + 10% pb	391	783	1174

- 30 Los resultados indican que el uso de Stemline o Ultraculture cuando se añade plasbumina (pb) o albúmina, lo cultivos primarios se expanden hasta un nivel que es al menos 4 veces y tanto como 10 veces el obtenido usando metodología anterior (DMEM con suero bovino fetal). Incluso el uso de plasbumina (pb) en el medio basal DMEM tuvo como resultado una composición de células derivadas del amnios expandidas que tienen un incremento de 3 veces en las células multipotenciales en comparación con el procedimiento anterior de usar DMEM con suero bovino fetal.
- 35

- Otro resultado significativa observado fue las células cultivadas en medio que contiene plasbumina mostraron un fenotipo esferoideo tras el pase. Cuando las células derivadas del amnios se extrajeron de la superficie del cultivo tisular con la enzima digestiva y se volvieron a sembrar y las células derivadas del amnios formaron pequeños grupos de células no firmemente adheridos a la superficie del cultivo. Algunos de los grupos de células estaban completamente en suspensión. Estos grupos de células derivadas del amnios proliferaron hasta 200 células que estaban presentes en los grupos. Tras un periodo de 1-5 días, los grupos de células se volvieron a unir y aplanador para formar una monocapa adherente. Este fenotipo de agrupamiento se observó en cada pase. Otros estudios indicaron que dicho agrupamiento se produce en los medios siguientes que contienen albúmina humana recombinante, plasbumina o plasmanato: OptiPRO SFM, VP-SFM, Iscove's MDM, HPGM, UltraMDCK, Stemline II y Stemline I, DMEM, and DMEM:F12, pero no en Advanced DMEM, KnockoutDMEM, 293 SFM II, Pro293S-CDM, Pro 293A-CDM o Ultraculture VPSFM.
- 40
- 45

### Ejemplo 2: Escalada de células derivadas del amnios en perlas microtransportadoras en matraces giratorios

- 50 Procedimientos - Una de las técnicas más habituales y antiguas para mantener las células en cultivo de suspensión es mediante el uso de matraces giratorios. Las células pueden unirse a perlas microtransportadoras (adherentes) o crecer completamente sin ninguna unión a la superficie (no adherente). En cualquier caso, estos matraces consisten en un vaso estéril que contiene un mecanismo de agitación magnética que permite agitación continua del medio y las células en condiciones estériles. Esta agitación continua facilita la difusión de los nutrientes, estimular la oxigenación del medio y elimina los gradientes de concentración. Los vasos se agitan en un incubador de CO<sub>2</sub> de temperatura controlada.
- 55

Las células derivadas del amnios son un tipo de célula epitelial dependientes de anclaje que pueden interferir o

prevenir su adaptación a un sistema de suspensión puro. Aunque las células derivadas del amnios pueden sobrevivir en cultivo en suspensión, la proliferación de estas células puede no ser óptima sin ningún sustrato para la unión y/o muchas de las células en suspensión pueden sufrir diferenciación preliminar. Un procedimiento de abordar esto manteniendo la capacidad para crecer de las células en un sistema tridimensional es cultivar las células en perlas microtransportadoras. Normalmente, los microtransportadores son perlas pequeños (de 30-1.000  $\mu\text{m}$  de

diámetro) de cristal, poliestireno o dextrano con un tratamiento de superficie para potenciar la unión. Los microtransportadores proporcionan la ventaja de un área de superficie muy grande a la que las células se unen y permite el cultivo a densidades muy altas en un volumen de medio mínimo. Por ejemplo, 1 gramo en peso seco de microtransportadores típicos es igual a 2.000  $\text{cm}^2$  del área de superficie. Un número pequeño de microtransportadores en medio de cultivo celular puede soportar el crecimiento de números significativos de células dependiente de anclaje.

Cultivo adherente: Las células derivadas del amnios aisladas de 3 placentas diferentes se introdujeron en matraces giratorios con perlas microtransportadoras (células adherentes) o matraces T normales (células adherentes estáticas control) y se incuban a 37 °C a 5 % de  $\text{CO}_2$  en aire. Las células y las perlas se sembraron en los matraces giratorios a una proporción de 1 g de perlas por  $66 \times 10^6$  células. En cada matraz R se sembraron  $10 \times 10^6$  células. Periódicamente, se contaron las células y se evaluó la viabilidad usando un analizador celular uava PCA-96 Personal Cell Analyzer (paquete ViaCount). Para este análisis se usaron tan pocos como 20  $\mu\text{l}$  de la muestra. Un gráfico o los recuentos de células viables y totales por ml se representan frente al tiempo para garantizar que las células nios se dividen y siguen siendo viables con el tiempo en cultivo.

Resultados - En los tres experimentos se demostró que las células derivadas del amnios podían proliferar hasta al menos 1,5 veces la densidad de siembra, lo que demuestra que los procedimientos de cultivo en matraz giratorio con perlas microtransportadoras son una alternativa viable al cultivo estático.

### **Ejemplo 3: Escalada de las composiciones de células derivadas del amnios en suspensión**

Las células derivadas del amnios se cultivaron en placas de 6 pocillos de cultivo tisular de adherencia ultrabaja (Corning) en varios medios de cultivo celular en mamíferos. Estos medios de cultivo se seleccionaron en base a su capacidad para estimular la proliferación de otros tipos celulares de mamífero en cultivo en suspensión (es decir, 293S, Ultraculture, Opti-MEM). En este experimento, los aditivos al medio de cultivo incluyen una fuente patentada de proteínas y EGF (10-20 ng/ml), en el que experimentos preliminares muestran que se requieren para proliferación de células derivadas del amnios. Las células derivadas del amnios se sembraron a una densidad de  $1,3 \times 10^6$  células/pocillo y los cultivos se mantuvieron a 37 °C en  $\text{CO}_2$  al 5 % en aire. El medio de cultivo se sustituyó cada dos días y el número de células se evaluó semanalmente. Los experimentos preliminares mostraron que las células derivadas del amnios en ocasiones forman pequeños grupos en flotación en las condiciones de cultivos en suspensión. Estos grupos se deben dispersar para garantizar un recuento celular preciso y esto se consiguió incubando los cultivos en tripsina durante 5-10 minutos antes del recuento. Se contaron las células y se evaluó la viabilidad usando un analizador celular uava PCA-96 Personal Cell Analyzer (paquete ViaCount). Para este análisis se usaron tan pocos como 20  $\mu\text{l}$  de la muestra. Un gráfico o los recuentos de células viables y totales por ml se representan frente al tiempo para garantizar que las células nios se dividen y siguen siendo viables con el tiempo en cultivo. Las células se subcultivaron en  $1,3-1,5 \times 10^6$  células por pocillo. Los cultivos se mantuvieron hasta que la proliferación cesó. Los cultivos adherentes control se mantuvieron en placas de 6 pocillos tratados con cultivo tisular para comparar las tasas de proliferación entre cultivos adherentes y en suspensión. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en 5% de  $\text{CO}_2$  en aire. El pase de las células adherentes se realizó en confluencia. Los cultivos adherentes se sometieron a digestión con tripsina y se lavaron antes de volver a sembrar en placas a  $1,3 \times 10^6$  células/pocillo. Los recuentos celulares y la viabilidad se midieron en las células adherentes en cada pase. Los medios de cultivo se analizaron en 5 tejidos donantes diferentes para representar la variabilidad tisular.

Resultados: De las 5 placentas analizadas, 4 mostraron una proliferación de al menos 2 veces, al menos hasta el día 20 en las condiciones analizadas, lo que demuestra que los procedimientos de cultivo estático no adherente son una perla microtransportadora alternativa viable o el cultivo en matraz adherente.

### **Ejemplo 4: Adición de aditivos del factor de crecimiento para estimular una proliferación más extensa**

Tras la selección de un medio de cultivo que soporta el cultivo en suspensión en placas de 6 pocillos se analizan varios factores de crecimiento como aditivos para estimular una proliferación más extensa en condiciones de cultivo en suspensión. Estos factores de crecimiento incluyen EGF, IGF-1, IGF-II,  $\alpha\text{FGF}$ ,  $\alpha\text{FGF-h}$ ,  $\beta\text{FGF}$ , FGF-4, FGF-8, KGF, SCF, Fsk, SHh, Prog, Wnt-1, CT, VPA. Estos y otros factores que se sabe que estimulan la proliferación celular o disminuyen la apoptosis o anoikis se analizan a varias concentraciones en los cultivos de suspensión para determinar sus efectos sobre la proliferación. Se realizan pruebas adicionales para garantizar que estos factores no están estimulando la diferenciación ni cambiando el perfil secretor de las células.

### **Ejemplo 5: Cultivo de células derivadas del amnios en matraces giratorios o frascos rotatorios son unión a microtransportador**

Tras la selección de un medio de cultivo que soporta la proliferación de las células derivadas del amnios en suspensión con o sin la adición de factores de crecimiento distintos a EGF, se realizan experimentos para evaluar la proliferación de las células en un birreactor agitado. Las células derivadas del amnios se introducen en los matraces giratorios (células en suspensión;  $3 \times 10^5$  células/ml). Las células adherentes cultivadas en matraces T se usan como controles (células adherentes  $1,3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>). Todos los cultivos se incuban a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Los matraces giratorios se tratan con Sigmacote (Sigma-Aldrich) antes de usar para prevenir la unión de las células al cristal. Los matraces se agitan introduciéndolos en una placa de agitación magnética. Se extraen muestras diarias de células en una campana de bioseguridad de clase II, de cada matraz giratorio, y se cuenta el número de células y se evalúa la viabilidad usando un analizador celular Guava PCA-96 Personal Cell Analyzer (paquete ViaCount). El uso de múltiples matraces giratorios permite el uso de 3 duplicados de cada condición por experimento.

Uno de los retos de un sistema de matraces giratorios es la exposición de las células a fuerzas de cizalladura causadas por el impulsor de la rotación. Una alternativa más suave a los matraces giratorios es cultivar las células en frascos rotatorios. Los frascos rotatorios tratados con cultivo tisular (1,2 l; Corning) se tratan previamente con metacrilato de 2-hidroxietilo (Poly-Hema) para prevenir la fijación de las células. Los frascos rotatorios que contiene 30-40 x 10<sup>6</sup> células derivadas del amnios se introducen en un aparato para frascos rotatorios Integra Biosciences). Se obtienen muestras de las células cada dos semanas y se evalúa la viabilidad y la proliferación, como se ha indicado anteriormente.

#### **Ejemplo 6: Anticuerpos que reaccionan con marcadores de proteína de superficie de las células derivadas del amnios**

Los anticuerpos monoclonales que reaccionan con marcadores proteicos de las células derivadas del amnios sobre la superficie de las células derivadas del amnios se pueden usar para separar la población celular en una población sustancialmente purificada de las células derivadas del amnios y serán útiles en la caracterización de cada población sustancialmente purificada de las células derivadas del amnios según sus características de células madre. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden usar para aislar un marcador proteico de célula madre único de la población sustancialmente purificada de las células derivadas del amnios. El marcador proteico recién identificado se puede usar para aislar una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. Por tanto, en el presente documento se describen marcadores únicos sobre las células derivadas del amnios, el marcador proteico aislado, el ácido nucleico aislado que codifica el marcador proteico, así como los vectores de expresión capaces de expresar el marcador proteico cuando se transfecta en células de mamífero tales como CHO, COS, etc. También se describen células bacterianas portadoras del vector para la propagación del vector.

También se contempla el uso de anticuerpos conocidos para identificar y crear poblaciones sustancialmente purificadas de las células derivadas del amnios que tienen combinaciones únicas de marcadores útiles como características de identificación de las poblaciones sustancialmente purificadas. Esta única combinación de marcadores se puede usar para aislar, caracterizar, purificar o crear una población sustancialmente purificada de las células derivadas del amnios que tiene dichas características.

Todas las caracterizaciones celulares descritas en el presente documento se realizaron usando células derivadas del amnios recién aisladas. Un experto en la técnica reconocerá que el patrón de expresión de los marcadores puede variar en función de las condiciones de cultivo y el tiempo en cultivo. Por ejemplo, el patrón de expresión de los marcadores proteicos observado en las poblaciones expandidas de la invención que se describen en el presente documento puede ser diferente del observado en las células derivadas del amnios recién aisladas. Además, el experto en la técnica reconocerá que el orden en el que las células se ponen en contacto con los anticuerpos no es crucial para obtener las poblaciones deseadas de células derivadas del amnios. La Tabla 2 muestra los resultados del análisis FACS de las células derivadas del amnios recién aisladas del amnios de una placenta. Los anticuerpos usados, solos o en combinación, pueden ser útiles para identificar, aislar, caracterizar, purificar o crear una población sustancialmente purificada de las células derivadas del amnios. Una realización preferida es el uso de anticuerpos anti-CD90 y anti-CD117 para identificar, aislar, caracterizar, purificar o crear una población sustancialmente purificada de las células derivadas del amnios. Otras realizaciones preferidas para identificar, aislar, caracterizar o crear poblaciones sustancialmente purificadas de las células derivadas del amnios incluyen poner en contacto las células con anticuerpos anti-CD90, anti-CD117 y anti-CD105; poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD117 y anti-CD105 y (ii) con al menos un anticuerpo seleccionado del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD140b, anti-CD34, anti-CD44 y anti-CD45s; poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90 y anti-CD117 y (ii) con un anticuerpo anti-CD29; poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD117 y anti-CD105 y (ii) con un anticuerpo anti-CD29; poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD117 y (ii) los anticuerpos anti-CD29 y (iii) con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD9, anti-CD10, anti-CD26, anti-CD71, anti-CD166, anti-CD227, anti-EG F-R, anti-SSEA-4 y anti-HLA-G; poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD117 y anti-CD105 y (ii) y los anticuerpos anti-CD29 y (iii) con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD9, anti-CD10, anti-CD26, anti-CD71, anti-CD166, anti-CD227, anti-EGF-R, anti-SSEA-4 y anti-HLA-G; poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD117 y anti-CD105 y (ii) y los anticuerpos anti-CD29 y (iii) con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los

anticuerpos anti-CD140b, anti-CD34, anti-CD44, y anti-CD45; b) poner en contacto las células con (i) los anticuerpos anti-CD90, anti-CD117 y anti-CD105 y (ii) y los anticuerpos anti-CD29 y (iii) con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD140b, anti-CD34, anti-CD44, y anti-CD45 y (iv) con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD9, anti-CD10, anti-CD26, anti-CD71, anti-CD166, anti-CD227, anti-EGF-R, anti-SSEA-4, y anti-HLA-G; y poner en contacto las células con uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD90, anti-CD117, anti-CD140b, anti-CD34, anti-CD44, y anti-CD45; y uno o más anticuerpos seleccionados del grupo constituido por los anticuerpos anti-CD29, anti-CD9, anti-CD10, anti-CD26, anti-CD71, anti-CD166, anti-CD227, anti-EGF-R, anti-SSEA-4, y anti-HLA-G.

**Tabla 2**

Población %	Designación	Marcador de superficie:			
~95-100%	+++	CD9	CD29		
~70-95%	++	SSEA4	CD10	CD166	CD227
~60-95%	+	HLA-G	EGFR	CD26	
~10-50%	+/-	CD71			
<1%	-	CD34	CD44	CD45	CD140b
		CD90			
		CD105			
		CD117			

La Tabla 3 muestra donde se pueden obtener los anticuerpos útiles para la práctica de los procedimientos de la invención.

**Tabla 3**

Nombre del anticuerpo	Manu.	Nº cat.	Nombre del anticuerpo	Manu.	Nº cat.
CD117 PE	BD-Pharm	555714	CD44APC	BD-Pharm	559942
CD44 PE	BD-Pharm	555479	CD45 APC	BD-Pharm	555485
CD45 PE	BD-Pharm	555483	CD140bPE	BD-Pharm	558821
EGFR PE	BD-Pharm	555997	CD90 Biotin	BD-Pharm	555594
CD105 FITC	Chemicon	CBL418F	CD26	BD-Pharm	
CD117 APC	BD-Pharm	550412	CD166	BD-Pharm	
CD29 APC	BD-Pharm	559883	CD10	BD-Pharm	
CD34APC CD227	BD-Pharm BD-Pharm	555824	CD71 CD9	BD-Pharm BD-Pharm	

**Ejemplo 7: Generación de poblaciones enriquecidas de células derivadas del amnios**

Los marcadores proteicos de células derivadas del amnios expresados sobre la superficie celular se pueden usar para enriquecer las poblaciones de células derivadas del amnios que expresan dichos marcadores proteicos usando diversos procedimientos. Dichos procedimientos pueden implicar una selección positiva, tal como el pase de células de la muestra por una columna que contiene anticuerpos del marcador proteico o mediante la unión de las células a anticuerpos conjugados con perlas magnéticas frente a los marcadores proteicos o por selección en placas revestidas con anticuerpos del marcador proteico y recolectar las células unidas. Como alternativa, una suspensión de una célula se puede exponer a uno o más anticuerpos marcados con fluorescencia que se unen inmunoespecíficamente a los marcadores proteicos de las células derivadas del amnios. Tras la incubación con el anticuerpo o los anticuerpos adecuados, las células derivadas del amnios se lavan en tampón para eliminar cualquier anticuerpo no unido.

Las células derivadas del amnios que expresan el o los marcadores proteicos se pueden clasificar mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), por ejemplo un citómetro de flujo Becton Dickinson FACStar. Para enriquecer las poblaciones de las células que expresan un marcador(es) proteicos deseados, las células se pueden someter a múltiples rondas de clasificación con FACS.

Además, los marcadores proteicos que no se expresan sobre la superficie de las células derivadas del amnios también se pueden usar para enriquecer las poblaciones de células derivadas del amnios que no expresan dichos marcadores. Dichos procedimientos pueden implicar un procedimiento de selección negativa, tal como el pase de células de la muestra por una columna que contiene anticuerpos del marcador proteico o mediante la unión de las células a anticuerpos conjugados con perlas magnéticas frente a los marcadores proteicos o por selección en placas revestidas con anticuerpos del marcador proteico y recolectar las células no unidas. Como alternativa, una suspensión de una célula se puede exponer a uno o más anticuerpos marcados con fluorescencia que se unen inmunoespecíficamente a los marcadores proteicos. Tras la incubación con el anticuerpo o los anticuerpos adecuados, las células se lavan en tampón para eliminar cualquier anticuerpo no unido. Las células que expresan el o los marcadores proteicos se pueden clasificar mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), por ejemplo un citómetro de flujo Becton Dickinson FACStar y se pueden eliminar estas células. Después se pueden recolectar las células restantes que no se unen a los anticuerpos se pueden recoger. Para enriquecer las poblaciones de las células que no expresan un marcador(es) proteicos deseados, las células se pueden someter a múltiples rondas de clasificación con FACS como se ha descrito anteriormente.

Ejemplos no limitantes de anticuerpos que puede ser útiles para generar dichas poblaciones enriquecidas de células derivadas del amnios incluyen los anticuerpos anti-CD10, anti-CD26, anti-CD71, anti-CD166, anti-CD227, anti-EGFR, anti-SSEA-4 y antiHLA-G.

- 5 Como alternativa, los anticuerpos pueden ser útiles para generar poblaciones enriquecidas de células derivadas del amnios eliminando las células indeseadas (es decir, conjugando los anticuerpos con perlas y añadiendo las perlas a una placa de cultivo que contiene una población heterogénea de células derivadas del amnios de un modo tal que las células en la población heterogénea que expresan el marcador al que está dirigido el anticuerpo se unirá a las perlas, de modo que las elimina de la población de células que no expresan el marcador). Ejemplos no limitantes de anticuerpos que pueden ser útiles en este proceso son los anticuerpos anti-CD140b, anti-CD34, anti-CD44, and antiCD45, anti-CD90, anti-CD105, y anti-CD117.

#### **Ejemplo 8: Biblioteca de anticuerpo monoclonal.**

- 15 Para construir una “biblioteca de anticuerpo monoclonal” se puede seleccionar un conjunto de varios anticuerpos monoclonales que identifica y aísla la población celular concreta responsable de la actividad de célula multipotencial característica de la población de las células derivadas del amnios de la presente invención. El panel de anticuerpos monoclonales se puede hacer reaccionar con tejido de placenta, una suspensión celular derivada de placenta o un cultivo de células derivadas de placenta. Las células que reaccionan con la colección de anticuerpos monoclonales se pueden identificar y aislar usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo FACS. En el presente documento se describe una colección de anticuerpos monoclonales que se usan para formar una biblioteca de anticuerpos monoclonales.

#### **Ejemplo 9: Uso de composiciones de células derivadas del amnios en la cicatrización de heridas.**

- 25 Procedimientos. - La línea celular de queratinocitos aislada de epidermis (ATCC CRL-1555) se sembró en placas de 6 pocillos a una densidad de  $0,3 \times 10^6$  células por pocillo. Las células se dejaron crecer hasta confluencia y después se introdujeron en condiciones sin suero durante 48 horas. En cada pocillo se realizó un raspado o herida de la monocapa confluyente desde arriba abajo del pocillo usando una punta de pipeta de 1 ml. Las imágenes del raspado se tomaron a 0, 24, 30 y 48 horas para determinar la migración celular o el porcentaje de cierre de heridas en respuesta a la adición de medio acondicionado a cada pocillo. Las condiciones analizadas fueron 0%, 50% y 100% de los siguientes: 1) sin medio acondicionado (control, 0%); 2) Medio acondicionado de las células derivadas del amnios pasadas normalmente a una proporción de 1:3; 3) Medio acondicionado de las células derivadas del amnios no pasadas; 4) Medio acondicionado de las células derivadas del amnios cultivadas en medios de las células de la ATCC y 5) Medio acondicionado de las células ATCC cultivadas en su propio medio. Se tomaron aproximadamente 6 mediciones en micrómetros de cada raspado en cada punto de tiempo usando microscopía de fase y software de imagen MetaMorph. El porcentaje de cicatrización se calculó comparando la anchura de cada herida a 24, 30 y 48 horas desde la anchura inicial de la herida a tiempo cero.

- 40 Resultados El medio acondicionado (CM) de células derivadas del amnios mostró un incremento significativo en la migración celular o la cicatrización del raspado en comparación con el control. No obstante, el CM de otros tipos celulares no mostró este incremento. Las células que crecieron en CM de células derivadas del amnios fueron la única condición que mostró un cierre completo del raspado antes de 24 horas. El CM de las células pasadas a una proporción de 1:3 y a una concentración del 50 % (CM/sin CM) produjeron los mejores resultados. Estos resultados sugieren que los componentes del CM de las células derivadas del amnios tienen propiedades que incrementan la migración celular o la cicatrización de heridas.

#### **Ejemplo 10: Las células derivadas del amnios, el medio acondicionado y los lisados celulares aceleran la reepitelización, la síntesis de colágeno y la recuperación de la resistencia a la tracción tisular.**

- 50 El siguiente experimento se realizó para evaluar si la aplicación de las células derivadas del amnios, el medio acondicionado de las células derivadas del amnios o los lisados de las células derivadas del amnios podrían: 1) acelerar la velocidad de reepitelización, 2) acelerar la síntesis de colágeno y el depósito en el lecho de la herida y 3) acelerar la recuperación de la resistencia a la tracción tisular y demostrar que el trasplante de células madre puede tener las mismas propiedades. También se realizó para evaluar si las células derivadas del amnios transplantadas podrían incorporarse en las estructuras epidérmicas y dérmicas, incluidos folículos, glándulas y vasos sanguíneos.

Modelo animal: Este estudio inicial usó un total de 90 ratas, distribuidas en los siguientes grupos (5 puntos de tiempo de sacrificio, 3 animales por grupo de tratamiento, 6 grupos por punto de tiempo), Tabla 4.

60

Tabla 4

Nº de Grupo	Tratamiento	Puntos de tiempo (días)				
		3	5	7	14	21
1	Control (sin tratamiento)	3	3	3	3	3
2	Medio no acondicionado + gelfoam	3	3	3	3	3
3	Medio acondicionado de células derivadas del amnios + gelfoam	3	3	3	3	3
4	Vehículo de ácido hialurónico	3	3	3	3	3
5	Células derivadas del amnios + Vehículo de ácido hialurónico	3	3	3	3	3
6	Lisado de Células derivadas del amnios + Vehículo de ácido hialurónico	3	3	3	3	3

Cada animal recibió 2 heridas dorsales de escisión de espesor completo, hasta un total de 180 heridas durante todo el estudio, con 6 heridas/grupo/punto de tiempo.

5 Heridas de la piel: Se realizó un par de heridas en cada lado de la línea media dorsal usando una biopsia por punción desechable (diámetro de 6 mm). Estas heridas tenían un espesor completo a través de la epidermis y la dermis. Las heridas se trataron con: Nada (control), vehículo (10 mm de esponja Gelfoam saturada con medio no acondicionado), medio acondicionado (10mm de esponja Gelfoam saturada con medio acondicionado de células derivadas del amnios), vehículo de ácido hialurónico (0,1 ml de gel Hylan A, Genzyme Corporation), ácido hialurónico + células derivadas del amnios marcadas con fluorescencia (pigmento CM-Dil, Molecular Probes, Eugene Oregon) ( $10^6$  células/herida) o ácido hialurónico + lisado de células derivadas del amnios (de  $10^6$  células/herida), inmediatamente después de la lesión (véase la Tabla 5 anterior). La totalidad de la piel dorsal se cubrió con un vendaje estéril (Tegaderm, 3M, Minneapolis, MN) asegurado con u adhesivo biocompatible (Mastisol, Ferndale Laboratories Inc, Ferndale, MI). Las heridas en los primeros tres grupos de tratamiento se volvieron a tratar de un modo idéntico los días 2, 3, 4 y 5 tras la formación de la herida. Tras el 5º tratamiento de la herida, se dejaron de tocar las heridas hasta el día 7, momento en el cual se retiró el vendaje estéril de Gelfoam y la herida se dejó cicatrizar expuesta al entorno que la rodea. Las heridas en los últimos tres grupos de tratamiento se dejaron sin tocar hasta el momento del sacrificio.

20 Imágenes y evaluación clínica: Dos observadores enmascarados evaluaron el grado de cicatrización de las heridas para cada una de las 180 muestras de herida a los siguientes días tras la lesión: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14 y 21. Se determinaron los parámetros siguientes: Hemostasia, contracción de la herida, reepitelización e inflamación. Se tomaron imágenes digitales de las muestras de heridas representativas para cada grupo de tratamiento y se almacenaron para su análisis posterior.

30 Análisis de los tejidos: Se sacrificó a los animales de acuerdo con el calendario anterior mediante administración intracardíaca de pentobarbital sódico y fenitoína sódica tras fuerte sedación con ketamina/xilazina. La piel dorsal se retiró usando técnicas asépticas y cada herida se diseccionó individualmente y se dividió. Una mitad de cada herida se usó para las mediciones de resistencia a la tracción, con la otra mitad incluida para congelar y análisis de imagen.

35 Tensiometría: Las muestras de las heridas de los grupos del día 7, 14 y 21 se analizaron mediante tensiometría. Para las mediciones de la resistencia a la tracción, las muestras congeladas se cortaron de grasa subcutánea y cualquier músculo tomado en la biopsia y se dividió en 4-5 muestras. El área transversal de cada muestra se midió con compás. Después, la muestra se pinzó en el tensiómetro y se ejerció fuerza hasta que se desgarró la piel. Las mediciones se registraron mediante ordenador y la resistencia a la tracción se calculó usando la fórmula: Lectura máxima en el tensiómetro (convertida en g) dividida por el área transversal (sq-mm)= Resistencia a la tracción (g/sq-mm). Los resultados para las muestras individuales de una herida se combinaron para determinar una TS media/herida (resistencia a la tracción por herida). Este valor se normalizó para la TS/piel (resistencia a la tracción de piel no dañada del lado opuesto), TS/herida dividido por TS/piel= TS relativa/herida. La TS relativa/herida se tabuló para cada grupo en cada punto de tiempo y se determinó la media y las desviaciones estándar usando software de base de datos Excel (Microsoft Office 2000).

45 Análisis microscópico: Las muestras de tejido se incluyeron en O.C.T. (Miles, Inc., Elkhart, IN) y se seccionó en crioestática en secciones de aproximadamente 10µm de espesor a -23 °C. Las secciones finas montadas sobre portas para microscopio de cristal se almacenaron en cajas para portas a prueba de humedad a -70 °C. Los portas representativos se procesaron para caracterización inmuohistoquímica de los componentes del tejido conjuntivo usando técnicas estándar. Se usó tinción con hematoxilina y eosina para determinar el aspecto histológico global de la mucosa dañada. La presencia de colágeno en la herida se analizó usando la tinción tricromo de Masson. Se usó el procedimiento de polarización-picrosirio para analizar la organización de las fibras de colágeno. El injerto y la supervivencia de las células madre marcadas con fluorescencia en el lecho de la herida se analizó semicuantitativamente midiendo la cantidad total de la fluorescencia presente en el lecho de la herida. La localización de las células se registró y analizó.

55

Se determinó el efecto de la tasa de la reepitelización de heridas y el depósito de colágeno dérmico y la organización. Cada uno de estos, además de otros componentes del proceso de cicatrización de heridas, se analizó usando marcadores específicos. El trasplante de células derivadas del amnios en el lecho de la herida dérmica se esperaba que tuviera como resultado: 1) diferenciación e injerto de células madre en varios compartimentos de la piel y 2) liberación regulada continua de varios factores de las células madre.

Resultados – Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 5 a continuación.

**Tabla 5**

Resumen	Medio acondicionado de las células derivadas del amnios	Células derivadas del amnios
Efectos positivos	1. Día 5: Heridas con CM, > formación de granulación contraída 2. Día 14: Heridas con CM de aspecto más pequeño >contraídas, > cicatrizadas 3. Heridas con CM exhibieron una reepitelización más rápida y angiogénesis	1. Reepitelización en puntos de tiempo tempranos 2. Angiogénesis en puntos de tiempo tempranos 3. Dinámica de la organización del depósito de colágeno
Efectos negativos	Ninguno	Sin detección de células injertadas
Si alterar	1. Síntesis y depósito de colágeno 2. Recuperación de la resistencia a la tracción tisular	1. Observaciones clínicas 2. Recuperación de la resistencia a la tracción tisular

Como se muestra en la Tabla 5, el tratamiento de heridas con medio acondicionado de células derivadas del amnios mostró un incremento de la formación de granulación contraída al día 5 y heridas más pequeñas, mayor contracción y cicatrización el día 14. Además, las heridas exhibieron reepitelización más rápida y angiogénesis en comparación con los controles. La síntesis y el depósito de colágeno y la conservación de la resistencia a la tracción de tejido no se alteraron durante el curso del experimento. El tratamiento de las heridas con células derivadas del amnios mostró reepitelización y angiogénesis en puntos de tiempo tempranos, así como pruebas de depósito y organización de colágeno. No se detectaron células injertadas. No se observaron diferencias basadas en la inspección visual en las observaciones clínicas (enrojecimiento, inflamación, tamaño, etc.) ni tampoco recuperación de resistencia a la tracción tisular modificada durante el experimento.

**Ejemplo 11: Detección de citoquinas en muestras de medio acondicionado y no acondicionado.**

Además de la pluripotencia, las células derivadas del amnios pueden desempeñar un papel significativo en la respuesta inflamatoria. En las primeras fases de la cicatrización de heridas, las quimioquinas y las citoquinas regulan la quimiotaxis y la activación de las células inflamatorias. Los factores de crecimiento desempeñan papeles dominantes en la proliferación, diferenciación celular y síntesis de la matriz extracelular. Se ha demostrado que las células epiteliales del amnios secretan muchas citoquinas y factores de crecimiento. Estos factores incluyen la prostaglandina E, PDGF, TGF- $\alpha$ , EGF, IL-4, IL-8, TNF, interferones, activina A, noggin, b-FGF, factores angiogénicos y otros factores neuroprotectores (Koyano, S., y col., (2002) *Dev Growth Differ* 44, 103-12; Blumenstein, M., et al., (2000) *Placenta* 21, 210-7; Tahara, M., y col., (1995) *J Clin Endocrinol Metab* 80, 138-46; Paradowska, E., y col., (1997) *Placenta* 18, 441-6; Denison, F. C., y col., (1998) *Hum Reprod* 13,3560-5; Keelan, J. A., (1998) *Placenta* 19, 429-34; Sun, K., y col., (2003) *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5564-71; Uchida, S., y col., (2000) *J Neurosci Res* 62, 585-90).

Muchas de estas citoquinas están asociadas con la cicatrización de heridas y algunas tienen el crédito de la contribución a la cicatrización sin cicatrices en el feto (Robson, M. C., y col., (2001) *Curr Probl Surg* 38, 72-140; Ferguson, M. W. et al., (2004). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, 839-50).

Para determinar cual de estas citoquinas puede ser secretada por las células derivadas del amnios de la presente invención se aisló medio acondicionado de las células derivadas del amnios de los cultivos celulares sembrados sobre los matraces tratados con cultivo tisular de ~40.000 células por cm<sup>2</sup>. Las células se cultivaron en medio sin suero patentado suplementado con 10 ng/ml de EGF. El medio de cultivo se cambió cada 3 días durante el periodo de crecimiento. Una vez que las células alcanzaron la casi confluencia (~1-2 semanas tras el aislamiento) se aplicó medio fresco y se recolectó el medio acondicionado tras tres días y se almacenó a -80 °C para su posterior análisis.

El medio acondicionado se analizó para detectar el contenido de proteína secretada mediante matrices de anticuerpos para detección de múltiples proteínas RayBiotech, Norcross, GA usando RayBio® Human Cytokine Antibody Arrays V, VI, and VII). Las muestras analizadas se muestran en la Tabla 6 que se expone a continuación.

**Tabla 6**

1. Medio no acondicionado completo + plasbumina
2. Medio no acondicionado completo + EGF (sin plasbumina)
3. Medio acondicionado de placenta 1 + plasbumina
4. Medio acondicionado de placenta 1 (sin plasbumina)
5. Medio acondicionado de placenta 2 + plasbumina

Resultados - La Tabla 7 proporciona lo resultados de este experimento.

5

**Tabla 7**

Citoquinas relevantes en la cicatrización de heridas	
Positivas en medio acondicionado	Negativa
Angiopoyetina-2, Angiogenina, bFGF, EGF, FGF-7, FGF-4, IGF-1, IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-Ra, PDGF-Rb	TGF-a, TGF-beta 1, TGF-beta2, TGF-beta3

**Ejemplo 12: Co-cultivos de células derivadas del amnios/Fibroblastos**

10 En la literatura se ha comunicado que en ciertas condiciones cuando se co-cultivan células ES con fibroblastos, las células ES son inducidas para diferenciarse en células similares a queratinocitos. Para determinar qué efecto tendría el co-cultivo de células derivadas del amnios con fibroblastos sobre las células derivadas del amnios se realizó un experimento en el que se co-cultivaron  $3,3 \times 10^6$  células derivadas del amnios con  $0,4 \times 10^5$  fibroblastos en un matraz T25 revestido con colágeno IV durante 3, 5, 10, 15 y 25 días.

15 Resultados. Cuando se trataron con la enzima similar a la tripsina Tryple (Invitrogen), tanto los cultivos de células derivadas del amnios y como los cultivos de fibroblastos solos liberan células como suspensión celular sencilla. No obstante, cuando se trató el co-cultivo de células derivadas del amnios /fibroblastos con Tryple, las células subieron a la superficie del cultivo tratado en forma de láminas en lugar de cómo una única suspensión celular. Además, las láminas eran muy estables y algo resistentes a las alteraciones enzimáticas y mecánicas.

20 Se ha teorizado que estas láminas pueden ser adecuadas para usar como vendajes para heridas cuando sea deseable tener un injerto de tipo dérmico. Con el reciente éxito demostrado en la reanimación mitral, el tratamiento de las lesiones por inhalación, el controle la sepsis por quemaduras y los conocimientos de la respuesta hipermetabólica, la extirpación temprana y el rápido cierre de la quemadura con un integumento se convierte en una terapéutica obligatoria. En quemaduras de área superficial pequeña, esto se puede conseguir mediante injertos cutáneos autógenos. Para quemaduras de área superficial grande, de espesor tanto parcial como completo, todavía no hay una solución completamente satisfactoria. Los autoinjertos epiteliales cutáneos se pueden cultivar a partir de la piel del paciente y expandir masivamente para cubrir todo el cuerpo. Por desgracia, la falta de dermis conduce a una fragilidad prolongada y a cicatrices significativas, por tanto, muchos creen que se requiere una "dermis" además de un epitelio.

30 Recientes productos con un supuesto sustituto dérmico o neodermis, como Integra, Alloderm, Transcyte, Apligraf, y Dermagraft, han intentado resolver el problema. No obstante, todos estos sustituto "de piel" tienen el problema de ser caros y de que tienen una resistencia a la infección menor que la de los autoinjertos. Sin un cierre de heridas fiable, rápido y satisfactorio para heridas por quemaduras, la herida seguirá en la fase inflamatoria de la cicatrización durante un periodo de tiempo prolongado, lo que da lugar a cicatrices excesivas.

40 Robson y col. (Robson, M. C., y Krizek, T. J. (1973) Ann Surg 177, 144-9.) notificaron el éxito en el tratamiento de quemaduras experimentales y clínicas (de espesor tanto parcial como completo) usando membranas amnióticas humanas. Se pensó que parte del efecto observado con el tratamiento de membranas amnióticas se debía a una sustancia o sustancias humorales que estimulan la cicatrización de heridas. Estas observaciones fueron anteriores a los conocimientos actuales de las citoquinas y los factores de crecimiento. Más recientemente se han realizado intentos de usa factores de crecimiento recombinantes y hormonas de crecimiento que afectan a una cicatrización más rápida de la herida por quemadura. Se probó que las membranas amnióticas no eran prácticas por el riesgo de enfermedades de transmisión vírica. No obstante, las observaciones de dichos experimentos tempranos y acopladas con los nuevos conocimientos respaldan la posibilidad de que la pluripotencialidad de las células derivadas del amnios y su ahora demostrado perfil secretor de proteínas de citoquinas y otras sustancias humorales estimuladoras de la cicatrización de heridas pueden ser útiles para proporcionar un cierre temprano y rápido de las lesiones térmicas.

**Ejemplo 13: Efectos del medio acondicionado células derivadas del amnios en un modelo animal de cicatrización de heridas.**

55 Un modelo animal de heridas agudas producidas por escisión se usó para evaluar el efecto del medio acondicionado de las células derivadas del amnios sobre la cicatrización de heridas.



5 Procedimientos: Modelo de heridas agudas por escisión: Veinte ratas macho Sprague-Dawley de 250-300 g de peso fueron anestesiadas con ketamina (40 mg/kg), xilazina (10 mg/kg) y acepromazina (0,75 mg/kg). Tras la anestesia, se depiló el dorso de cada animal y se trazaron cuatro áreas simétricas en la línea media de 1,5 x 1,5 cm sobre la piel usando un molde de cobre. Después se crearon cuatro heridas mediante escisión de las áreas marcadas a través de la piel y el músculo del panículo carnoso. Los animales se dividieron en los siguientes grupos de 5 (Tabla 8).

Tabla 8

Nº de grupo	Condiciones experimentales
I	Medio acondicionado, no infectado
II	Medio no acondicionado, no infectado
III	Medio acondicionado, infectado
IV	Medio no acondicionado, infectado

10 Se realizaron trazados de análogos cada 72 horas sobre láminas de acetato de áreas de heridas abiertas y de los bordes de la piel de espesor completa de todas las heridas. Para eliminar una variabilidad relacionada con el sitio en las heridas, solo se midieron las tres heridas caudales con fines estadísticos, ya que se ha demostrado que la herida más cefálica tiene características de cicatrización diferentes. Se realizaron los cálculos del área de la herida con el uso de planimetría digital (Sigma Scan; Jandel Scientific, Corte Modera, CA). Se realizaron análisis bacterianos cuantitativos semanales en un subconjunto de heridas en cada grupo y se expresan como UFC/g de tejido.

15 Una vez que las cuatro heridas de cada animal se habían epitelializado completamente, determinado mediante inspección visual, se sacrificó a los animales y se retiró todo el dorso de la rata, incluido el panículo carnoso. Se obtuvo una tira de piel de 1 cm de anchura perpendicular a cada cicatriz resultante para romper el análisis de resistencia. Se usó un tensiómetro Instron (Modelo No. 4201; Instron Corp., Canton, MA) con una celda de carga de tensión de 5 kg y una velocidad de cabezal de 10 mm/min. La rotura de la resistencia se define como la fuerza necesaria para romper la cicatriz y se expresa en kilogramos.

20 Resultados - La aplicación de medios acondicionados supera la inhibición de la cicatrización de heridas causada por bacterias y desvía la trayectoria de la cicatrización en heridas contaminadas de la cicatrización casi normal (Figura 2).

#### 30 **Ejemplo 14: Efectos del medio acondicionado células derivadas del amnios en un modelo animal de cicatrización de heridas crónicas.**

30 Procedimientos: Modelo de heridas crónicas por granulación: Veinte ratas macho Sprague-Dawley de 300-350g de peso fueron anestesiadas con ketamina (40 mg/kg), xilazina (10 mg/kg) y acepromazina (0,75 mg/kg). Tras la anestesia se afeitó y depiló el dorso de cada animal. Se creó una quemadura dorsal de espesor completo de 30 cm<sup>2</sup> cuadrados mediante inmersión en agua en ebullición. Los animales del grupo contaminado se siembran con 5 x 10<sup>8</sup> Escherichia coli ATCC #25922 después de dejar enfriar las ratas durante 15 minutos. Las bacterias se obtienen de un cultivo fresco en caldo de 18 horas y el tamaño del inóculo se confirma mediante siembra inversa. Los animales se dividen en 8 grupos iguales de 5 cada uno para proporcionar diferentes tratamientos tras las escariectomías a los 5 días.

40 Los animales se enjaulan individualmente y se les ofrece agua y alimentos a demanda. Cinco días después de la quemadura, la escara se escinde de los animales anestesiados y se tienen como resultado una herida crónica granulada. Las características histológicas de esta herida en comparación con la herida de granulación humana se han realizado anteriormente. Las heridas se tratan con los mismos grupos experimentales que se describen en la Tabla 9 anterior. Cualquier exudado seco formado se elimina sin traumatismos antes de cualquier trazado o biopsia de la herida. Cada 72 horas se trazan los bordes de las heridas sobre láminas de acetato y se realizan los cálculos del área usando planimetría digital. Se deben tomar precauciones para registrar solo el avance del margen de espesor completo y no cualquier borde de epitelio que esté avanzando. Esto evita el componente pequeño del avance proporcionado por el neopitelio liso, rosa, translúcido y sin pelo. Las mediciones del área en serie se representan frente al tiempo. Para cada dato de cada animal se proporciona una ecuación de Gompertz (r<sup>2</sup> típica= 0,85). Usando esta curva se estima la semivida de la herida. La comparación entre grupos se realiza usando el análisis de la tabla de la vida y la prueba de rangos de Wilcoxon. El análisis estadístico se realiza usando SAS (SAS/STAT Guide for Personal Computers, Version 6 Edition, Cary, NC, 1987, p. 1028).

#### 55 **Ejemplo 15: Efectos de las células derivadas del amnios en dos modelos animales de cicatrización de heridas.**

Los dos modelos animales de heridas por granulación descritas anteriormente en los Ejemplos 13 y 14 se usan para evaluar el efecto de las células derivadas del amnios sobre la cicatrización de heridas. Los grupos del experimento se muestran en la tabla 9.

60

Tabla 9

Nº de grupo	Condiciones experimentales
I	Control no contaminado (solo PBS)
II	Control contaminado (PBS + bacterias)
III	Tratados no contaminados con células
IV	Tratados contaminados con células

**Ejemplo 16: Capacidad de las células derivadas del amnios para estimular la regeneración completa de heridas profundas.**

5 Los experimentos se diseñan para estimular la regeneración completa de heridas profundas recreando todos los tejidos necesarios, incluidos hueso, músculo, cartílago, piel y tejido neural. Inicialmente, los experimentos in Vitro se diseñan para determinar si las células derivadas del amnios se pueden diferenciar en todas las células de interés. Las células derivadas del amnios se cultivarán como se ha descrito anteriormente, Las células madre mesenquimatosas (Cambrex, Rutherford, NJ) se usarán como control para los experimentos de diferenciación. Se sembrarán MSC a 5.000-6.000 células por cm<sup>2</sup> y se cultivan en medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas (MSGM, Cambrex, Rutherford, NJ).

15 Osteogénicas: Una vez que las células han llegado a confluencia se cambiará el medio de crecimiento (DMEM, 10% FBS, 1% pen/estrop) a medio de diferenciación osteogénico (Shi, Y. Y., et al., (2005) *Plast Reconstr Surg* 116, 1686-96.). (DMEM 10% FBS, 1% de pen/estrep, 250uM ascorbato-2-fosfato, 10mM beta glicerofosfato, ácido retinoico 2,5uM). El medio de diferenciación osteogénico se cambiará cada 2-3 días. La actividad de la fosfatasa alcalina de las células mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo se evaluará por duplicado tras 7 días de cultivo. La tinción con fosfatasa alcalina se realizará usando el kit de tinción de Fosfatasa Alcalina (Sigma) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los experimentos se realizarán por triplicado. La tinción de Von Kossa se realizará en pocillos por duplicado para evaluar la capacidad de las células para mineralizar la matriz extracelular y formar nódulos óseos. La tinción se realizará en las células tras 21 días de cultivo en pocillos por duplicado en condiciones de medio de diferenciación. Las células se fijarán en formalina tamponada neutra durante 30 minutos, se incubarán con 1 % de nitrato de plata acuoso durante 15 minutos en luz UV, se teñirán con 5 % de tiosulfato sódico durante 2 minutos y, por último, se contrateñirán con 1 % de safranina O durante 10 minutos. Además, se determinará la concentración de calcio en la matriz extracelular mediante ensayo colorimétrico bioquímico usando el Juego de Reactivo de Calcio (Biotron Diagnostics, Hemet, CA.) en pocillos por duplicado. Los experimentos se realizarán por triplicado.

30 Adipogénico: Las células derivadas del amnios y las MSC se cultivarán en medio de diferenciación adipogénico ((Shi, Y. Y., y col., (2005) *Plast Reconstr Surg* 116,1686-96.) durante 3 días (DMEM, 10% FBS, 1% pen/estrep, 10ug/ml insulina, 1uM dexametasona, 0,5mM metilxantina, 200uM indometacina), después se cambiará a medio de mantenimiento de adipocitos durante 2 días más (DMEM, 10% FBS, 1% pen/estrep, 1ug/ml insulina). Se realizará tinción con aceite Rojo O para evaluar la diferenciación adipogénica en pocillos por duplicado (como indica la presencia de gotas llenas de lípidos intracelulares) tras 5 días de cultivo en medio adipogénico. Las células se fijarán en 10 % de formalina tamponada neutra durante 30 minutos y después se incubarán en 60 % de solución de aceite Rojo O durante 30 minutos a 37 °C. Los experimentos se realizarán por triplicado.

40 Condrogénico: Las células derivadas del amnios y las MSC se cultivarán en medio de no diferenciación estándar y después se recolectarán y resuspenderán a una concentración de 1x 10<sup>7</sup> células/ml. Gotas de diez µl se colocarán en una placa de cultivo y se dejarán adherir al sustrato a 37 °C durante 2 horas. Después se añadirá medio condrogénico (Malladi, P., et al., (2006) *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C1139-46.) cuidadosamente alrededor de los agregados celulares (DMEM, 1% FBS, 1% pen/estrep, 37.5 ugl/ml ascorbato-2-fosfato, premezcla de ITS (BD Biosciences), 10 ng/ml de TGF-B1 (Research Diagnostics, Inc., Flanders, NJ). Las micromasas se fijarán en 4 % de paraformaldehído con 4 % de sacarosa durante 15 minutos, incluidas en el compuesto Optimal Cutting Temperature (O.C.T.). Se montarán criosecciones de diezµm sobre portas y se teñirán con hematoxilina y eosina y azul alcalino. Se realizará la inmunohistoquímica del siguiente modo. Se bloquearán las secciones a temperatura ambiente durante 30 minutos y se incubarán con anticuerpo primario a 4 °C durante la noche (anti-colágeno II Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Tras Incubación con anticuerpo secundario (Vector Labs, Burlingame, CA) 8 secciones se marcarán con reactivo ABC (Vector Labs, Burlingame, CA) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se aplicó DAB (Vector Labs, Burlingame, CA) a cada sección y se usará hematoxilina para contrateñir.

55 Miogénico esquelético: Las células derivadas del amnios y las MSC se cultivarán como se ha descrito anteriormente. La diferenciación biogénica esquelética se inducirá cultivando células en medio miogénico (Gang, E. J., et al., (2004) *Stem Cells* 22,617-24.) (medio de cultivo suplementado con 5% de suero de caballo, 0,1 µM dexametasona y 50 µM hidrocortisona) durante hasta 6 semanas. La diferenciación miogénica se analizará mediante FACS para MyoD1, miogenina y la cadena pesada de la miosina (MyHC). Para FACS, las células se desprenderán y teñirán secuencialmente con anticuerpos primarios (anticuerpos anti-MyoD y anti-miogenina humanos; Becton Dickinson) y anticuerpos secundarios conjugados con me (IgG1-FTIC de rata anti-humana; Becton Dickinson). Las células se fijarán con 2 % de formaldehído hasta el análisis con FACS. Para la detección de una proteína intracelular MyHC,

las células se permeabilizaron con metanol/PBS fríos durante 2 minutos a 20 °C antes de tefir con anticuerpo primario anti-miosina de ratón (fast, Sigma) y anticuerpo secundario conjugado con FITC.

**Ejemplo 17: Evaluación de la resistencia acelerada de la herida y prevención de la insuficiencia de heridas agudas.**

Un objeto de la invención es reducir la incidencia de fallos de la herida quirúrgica y optimizar los resultados de heridas quirúrgicas tratando estas heridas agudas con medio de crecimiento acondicionado a partir de células derivadas del amnios. El objeto es la cicatrización de heridas en músculo, fasciales y de piel *in vivo* tras lesión quirúrgica. Se aíslan fibroblastos de las heridas para medir el efecto de mediadores solubles derivados de células derivadas del amnios sobre la reparación de la función de los fibroblastos *in vitro*.

Procedimientos: En todos los experimentos se usan ratas macho Sprague-Dawley. Se afeita el pelo de la pared abdominal ventral y se limpia el campo con alcohol y agua estéril. Se realiza una incisión en la piel de espesor total de 6 cm 2 cm al lado de la línea media ventral y después se forma una aleta de piel de 4 cm de anchura y se eleva por encima del plano prefascial avascular que expone la línea alba. En las ratas operadas de forma simulada, esta aleta de piel se sustituye y sutura usando Prolene 4-0. En las ratas del grupo experimental se realiza una incisión por laparotomía aislada de 5 cm a través de la línea media de la capa muscular en la pared abdominal (línea alba). EL diseño del modelo de aleta cutánea en la pared abdominal ventral permite la cicatrización por laparotomía aislada de la herida de la piel de encima. En el grupo de heridas mecánicamente intactas, la laparotomía se repara con una sutura de 3-0 de polipropileno, usando pintos de sutura de 0,3 cm y un progreso de 0,5 cm entre los puntos. La sutura se ata a sí misma al final de la herida. La experiencia con este modelo predice una tasa de cicatrización de herida intacta del 100 %. En el grupo de heridas por hernias, la incisión de la laparotomía se deja sin suturar. En los modelos de heridas abiertas t heridas por hernias, la aleta de piel se sutura en su lugar, actúa como una cuerda para prevenir la evisceración de los órganos abdominales. Se ha encontrado que la mortalidad con estos modelos es inferior al 1%. Tras 30 minutos de recuperación en un colchón caliente se devuelve a las ratas a las jaulas individuales. Se proporcionan alimento y agua *ad libitum*. Todas las ratas son observadas diariamente y se pesan todas las semanas. La experiencia con estos modelos predice que al día 28 tras la operación, el 100 % de las ratas con heridas intactas cicatriza la incisión de laparotomía y el 100 % de las ratas con herida abierta llegan a sufrir hernias quirúrgicas.

En cada punto de tiempo se usan cinco ratas para generar 5 líneas celulares distintas de fibroblastos para cada uno de los cuatro tipos de herida por laparotomía. Se realizan las necropsias 1, 7, 14, 28 y 60 días después de las operaciones. En el grupo de heridas abiertas, el día 0 se redefine en el momento de la alteración de las heridas el día 3 después de la operación. Se escinde la totalidad de la pared ventral abdominal de cada rata eutanizada y la piel se separa de la capa muscular. Las superficies peritoneal y subcutánea (ventral) de cada pared abdominal se inspeccionan cuidadosamente para detectar la presencia de alteraciones y herniación en la herida de la laparotomía. Una hernia quirúrgica se define como un mínimo de 2 mm de separación miofascial y/o herniación obvia de la pared transabdominal de los contenidos abdominales. Las biopsias se toman perpendiculares al eje de la línea alba. Una biopsia de cada rata se ultracongela e inmediato en nitrógeno líquido para el posterior aislamiento de ARN y medición en PCR en tiempo real de la expresión de colágeno e integrina. Una segunda biopsia adyacente de cada rata se fijan inmediatamente en formalina tamponada al 10 % para la posterior fijación en parafina y análisis inmunohistológico de la estructura de la herida, la morfología de los fibroblastos, la respuesta inflamatoria, la angiogénesis y la formación de matriz extracelular. La biopsia de la herida final se introduce en PBS (véase Procedimientos, más adelante). Se usan cultivos de células fibroblastos de primer pase para medir la proliferación de los fibroblastos, la síntesis de colágeno y la compactación de la matriz de colágeno poblada por fibroblastos *in vivo* y tras patrones controlados de la cepa mecánica *in vitro*.

En este modelo se analiza una ganancia rápida de la resistencia de la herida del siguiente modo. Los animales se asignan aleatoriamente en uno de 12 grupos (n= 10 por grupo). En diseños experimentales 1 y 2, cada uno de los tres modelos animales (laparotomía simulada, cicatrización de laparotomía y hernia) se tratan con cuatro condiciones experimentales de medio acondicionado de células derivadas del amnios que contienen los productos humorales de las células derivadas del amnios. (Sin tratamiento, medios de células derivadas del amnios control (0 % acondicionado), 10 % CM de células derivadas del amnios y CM de de células derivadas del amnios 100 %). Véase la Tabla 10 para los Grupos Experimentales. 100 UI del medio se liberan en el sitio de la laparotomía miofascial y las incisiones en la piel antes de la formación de heridas. Esto se define como un simple cebado y establece que este es un modo fiable y eficiente de liberar el medio de crecimiento líquido en el sitio de las incisiones quirúrgicas con una gran experiencia en este modelo. Los fibroblastos se aíslan de heridas en cicatrización en el tiempo y se analiza el efecto de los medios de las células derivadas del amnios sobre la proliferación y la compactación de la matriz de colágeno *in vitro*.

Tabla 10

Tabla de Grupos experimentales			
Sin tratamiento	Medio no acondicionado, (0 % CM)	50%CM	100% CM
Simulado	Simulado	Simulado	Simulado
Herida	Herida	Herida	Herida
Hernia	Hernia	Hernia	Hernia

Las ratas con resistencia a la tracción en la incisión miofascial (laparotomía) y en la piel se seleccionan aleatoriamente y se sacrifican en puntos de tiempo en serie tras una laparotomía con una sobredosis de Nembutal (100 mg/kg, i.p.). Se escinde la totalidad de la pared abdominal ventral y la piel se separa de la capa musculofacial. La interfaz de cicatrización de heridas se examina estrechamente para detectar signos de fallo agudo (dehiscencia) o de formación de hernias quirúrgicas primarias, definidas como un defecto fascial superior a 2 mm en o después de POD 7. Dos tiras miofasciales y dos tiras de piel en forma de una letra "I" en mayúscula se toman perpendiculares a la interfaz de la cicatrización de heridas de cada pared abdominal. Se usa un molde de corte para marcar la pared abdominal con el fin de minimizar la variabilidad del tamaño entre especies. La pared abdominal miofascial y las tiras de piel se marcan y almacenan en PBS hasta que se realiza el análisis mecánico tensiométrico. Se toman biopsias de las heridas miofasciales (laparotomía) y de la piel, e inmediatamente se ultracongelan en nitrógeno líquido para análisis bioquímico o se fijan en formalina para histología.

Las pruebas mecánicas de la pared abdominal fascial y las tiras de piel se realizan en un plazo de 6 horas desde la necropsia. La anchura y el espesor de la muestra se mide con compás Digimatic (Mitutoyo American Corp., Chicago, IL). Las muestras se cargan cada una en tensión hasta el fallo, tiempo durante el cual se recogen datos de la extensión de la fuerza. Las curvas de la extensión de la fuerza se generan usando un Instron Tensiometer (modelo 5542, Instron Corporation, Canton, MA) equipado con una celda de carga estática 50 Newton con una velocidad de cabezal de 10 mm por minuto. Las muestras se montan en el marco de carga usando pinzas neumáticas, se precargan a  $N$  y se mide la longitud en gauge entre los agarres. El en el marco de carga aplica cargas de tensión perpendiculares a la sutura de reparación de heridas hasta que se produce la rotura mecánica del tejido. La localización anatómica del fallo de la herida no se anota para cada especie. Los datos de fuerza y de deformación del tejido se registran y capturan simultáneamente en un ordenador conectado al marco de carga mediante una tarjeta de interfaz digital. El análisis de datos se realiza usando el paquete de software de análisis de materiales Merlin (Instron Corporation, Canton, MA).

Los datos de la carga de resistencia se usan para determinar las siguientes propiedades biomecánicas importantes: Resistencia a la rotura- la carga máxima ( $F_{\text{máx}}$ ) al fallo mecánico ((Newtons); Resistencia a la tracción- Fuerza máxima desarrollada en las muestras por unidad de área, calculada como  $F_{\text{máx}}/\text{área transversal}$  ((N/mm<sup>2</sup>); Dureza. Energía absorbida por la muestra en tensión, calculada como la totalidad del área bajo la curva fuerza-extensión desde el origen de la rotura mecánica (Julios); Elongación- incremento de la longitud del tejido bajo carga, definida como la longitud de ala muestra durante la alteración mecánica menos la longitud original (mm); Rigidez- pendiente de la región elástica lineal de la curva fuerza-extensión (N/mm).

El análisis histológico de la estructura de la matriz provisional, la migración de los fibroblastos, la respuesta inflamatoria y la angiogénesis de heridas se usa para comparar los grupos usando tinción con H y E y tricromo. La densidad de la formación de colágeno en las heridas se mide usando anticuerpos específicos para el colágeno de rata de tipos I y III (Chemicon International, Inc., Temecula, CA). La infiltración celular en las heridas en cada punto de tiempo se mide como el número celular medio de tres campos de alta potencia observado por un observador enmascarado usando un microscopio. Además, las muestras histológicas se digitalizan usando un escáner UMAX Astra 1200S y se analizan usando la aplicación de software del ordenador Adobe PhotoShop versión 5.0. Las diferencias en la celularidad y la intensidad de la tinción del colágeno se comparan usando la prueba t de Student (SigmaStat, Jandel).

Las muestras se recogen de las heridas de laparotomía o hernias quirúrgicas de ratas o seres humanos tal como se ha descrito previamente y se introducen en un tubo cónico estéril de 50 ml (Corning, Corning NY) en PBS frío y se introduce en hielo. Cada muestra se pica en piezas pequeñas y se introducen en una placa petri estéril de 6 cm de diámetro (Falcon, Franklin Lakes NJ) que contiene 0,1 % de colagenasa en PBS durante minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo, los tejidos y las células se trituran varias veces usando una pipeta de cultivo tisular. La solución se vierte en un tubo cónico estéril de 50 ml y se centrifuga a 800 rpm durante 6 minutos. La colagenasa en PBS se elimina mediante aspiración y el sedimento de células restantes y tejido macerado se reconstituye en 15 ml de medio de crecimiento completo compuesto por DMEM con poca glucosa (GIBCO, Grand Island NY) suplementado con 10 % de suero bovino de neonato (GIBCO, Grand Island NY), 25  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina (GIBCO, Grand Island NY) y 0,375  $\mu\text{g/ml}$  de anfotericina B (Sigma, St. Louis MO). Las células se transfieren a un matraz T75 estéril (Corning, Corning NY) y se introducen en un incubador a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, el medio de crecimiento completo de cambia cada dos días cuando las células alcanzan un 10-15 % de confluencia con un mínimo de 6 colonias visibles usando un microscopio invertido con un objetivo de 5 aumentos. Se realiza tinción con citoqueratina estándar, actina alfa de músculo liso, vicentina y factor de von Willebrand para caracterizar de un modo preciso las células como fibroblastos.

Una vez que las células han alcanzado la confluencia, se pasan a 1:2. El medio se extrae y la capa celular se lava con 10 ml de HBSS (GIBCO, Grand Island NY). Las células se someten a digestión con tripsina con 10 ml de tripsina al 0,05 % con EDTA 0,53 mM (GIBCO, Grand Island NY) DURANTE 4-6 MINUTOS A 37 °C. La tripsina se inhibe usando 10 ml de medio de crecimiento completo. Las células se vierten en un tubo cónico estéril de 50 ml y se centrifuga a 600 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y el sedimento celular se resuspende en medio de crecimiento completo. Las células se dividen en matraces para dar una concentración de pase final de 1:2. Las células se someten a digestión con tripsina y se centrifugan como se ha indicado anteriormente y se reconstituyen en 4 ml de DMEM con 40 5 de suero bovino de neonato. Esta solución se divide en cuatro viales criogénicos de 2 ml (Corning, Corning NY), y a cada vial se añade 1 m de DMSO al 10 % enfriado (Fischer, Fairlawn NJ) en DMEM, Los viales se introducen en un contenedor con alcohol isopropílico y se enfrían a 01 °C en una nevera a -80 °C. Cuando están completamente congeladas se transfieren a nitrógeno líquido para su conservación.

Se extrae un criovial del nitrógeno líquido y rápidamente se descongela en etanol caliente. Los contenidos se vierten en un tubo cónico de 50 ml con 20 ml de medio de crecimiento completo templado y se centrifuga a 600 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y el sedimento celular se reconstituye en 15 ml de medio de crecimiento completo. Las células se siembran en un matraz T75.. Se usa un ensayo colorimétrico para acceder a la viabilidad de los fibroblastos midiendo su actividad mitocondrial.

Se usan matrices de proteínas *in vitro* (FPLC) con colágeno, fibrina y fibronectina. Las matrices de proteína de la matriz extracelular se preparan como ha descrito el fabricante (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Los geles se incuban durante 24 horas a 4 °C. Los fibroblastos se cuentan en su número de célula ajustado a  $10^5$  células/ml. A cada matriz de 3,5 cm prefabricada se añaden cien mil fibroblastos cultivados de primer pase. Las matrices se incuban a 37° C/5% de CO<sub>2</sub> y la extensión de la contracción del gel se mide cada 24 horas durante Las 5 días. Los geles se digitalizan cada día y las mediciones de la contracción se calculan usando Sigma Scan software (Jandel Scientific, Corte Madera, CA). Como alternativa, se usan PFLC fabricados de colágeno de cola de rata para datos de confirmación, Este ensayo se realiza durante 30 minutos a varias horas, y permite determinar la respuesta de las células para evaluar los diversos inhibidores funcionales. La medición de la contracción del gel se realiza con el tiempo. Los geles de colágeno se desprenden de las placas petri, se tratan con 2,5 % de FCS o 2 UI/ml de trombina y el diámetro del gel medio en el eje perpendicular a varios tiempos. Una función que se evalúa el papel de las MAP quinasas sobre la contracción del colágeno.

Para caracterizar además los fibroblastos faciales para explicar los efectos observado de los experimentos animales se realiza una serie de ensayos en los cultivos de fibroblastos dérmicos y de las heridas faciales. Estos incluyen la expresión génica del colágeno, tipos I y II, usando RT-PCR con ARN extraído; la medición de los niveles de colágeno tisular de las biopsias de la interfaz de la cicatrización de hernias usando el procedimiento de ensayo de colágeno Sircol ((Acurate Chemical and Scientific Corp., Westburg, NY); medición de la expresión de fibroblastos, alfa-1 y beta-1 integrina para asegurar que la reducción de la contracción del FPCL no se debía una escasa migración y reducción de la función de los fibroblastos e, inmunohistoquímicamente, para evaluar la acción alfa-2 de músculo liso, y el antígeno nuclear de las células en proliferación (PONA) usando anticuerpos monoclonales específicos para PCNA y alfa-SMA (Sant Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

El análisis estadístico es el siguiente. Para cada experimento un diseño factorial con muestras de tamaño equilibrado en cada grupo garantiza que el efecto principal, las variables independientes de cada experimento, se puede aislar con un análisis estadístico adecuado. Las variables de los resultados se comparan usando ANOVA paramétrico (variables continuas) y o paramétrico (proporciones). Se usan diseños de ANOVA anidada para incorporar el efecto principal de las variables de cada experimento en el análisis sencillo. En la proporción f para un ANOVA global es una comparación poshoc significativa de cada medio de grupos se realiza mediante puentes de ensato t de media de mínimos cuadrados para cada comparación. Inherente a este enfoque está la corrección de Bonferonni del nivel de significación al hacer múltiples comparaciones pareadas Los cálculos del ANOVA se realizan usando los modelos lineales generales (GLM), ALGORITMO DE Statistical Analysis System (SAS, Carey, NC), que representa muestras de tamaño no equilibrado, Los análisis poshoc pareados se llevan a cabo usando la opción de lsmean con el procedimiento de GLM Se examinan las correlaciones entre las variables medidas y, si se observa una covarianza significativa entra las variables para un experimento dado, el análisis de la covarianza (ANCOVA-8 se realiza según sea adecuado. Un nivel de 5% de significación se considera estadísticamente significativo.

**Ejemplo 18. Uso de células derivadas del amnios, medio acondicionado, lisados celulares y productos celulares para el cierre rápido y temprano de heridas de lesiones térmicas.**

El resultado y rehabilitación de las lesiones térmicas depende de la escisión precoz de la herida por quemadura y el rápido cierre de la herida. La velocidad del cierre de la herida con un integumento o integumento sustituto es la clave para mejorar la supervivencia. Proporcionar nuevos abordajes que faciliten el rápido y temprano cierre de la herida al tiempo que se minimizan las cicatrices duraderas es un objeto de la presente invención.

Se usan modelos animales *in vitro* establecidos y pacientes clínicos para evaluar el uso de células derivadas del amnios para un rápido y temprano cierre de la herida de quemaduras de espesor parcial o de espesor completo. Además de las lesiones térmicas se realizan experimentos con modelos establecidos para lesiones químicas,

eléctricas y por frío.

5 Se ha teorizado que las células derivadas del amnios pueden diferenciarse en células mesodérmicas y ectodérmicas. Por tanto, puede ser posible que el uso de dichas células proporcione un cierre temprano y permanente de la herida por quemadura. Desde ahora, el tiempo prolongado durante el cual la herida está en la fase inflamatoria es la variable conocida que conduce a cicatrización proliferativa, cabe esperar que el cierre temprano y permanente de la herida por quemadura de cómo resultado una disminución de la formación de cicatrices y, por tanto, un incremento de la función.

10 Procedimientos: Se usan tres modelos animales de lesiones térmicas de espesor parcial y de espesor completo. Los tres modelos son diferentes porque el primero simula cicatrización de espesor parcial mediante epitelización en aproximadamente tres semanas, mientras que el segundo y el tercero simulan cicatrización de espesor completo mediante contracción y epitelización y pueden permanecer sin curar durante hasta ocho semanas. Los últimos dos modelos se han comparado histológicamente con la herida de granulación humana. La diferencia en las dos últimas  
15 heridas de espesor completo es el huésped. Un grupo es una rata normal con un sistema inmunitario intacto, mientras que la otra es una rata atímica "desnuda" que carece de linfocitos T.

20 Lesiones de quemaduras de espesor parcial : Cuarenta cobayas hembra de la cepa Hartley de un peso de 350 a 450 gramos se usan en esta parte del experimento. Con anestesia de Nembutal (35mg/kg administrados por vía intraperitoneal), se afeita y depilan los dorsos de los animales. Se realiza una quemadura uniforme sobre el 10 % de la superficie del cuerpo a 75 °C durante 10 segundos. Las cobayas se usan para este modelo por su falta de ciclo del estro (célo) y por la capacidad de desarrollar lesiones uniformes de espesor parcial. Los animales se enjaulan individualmente y se les ofrece agua y alimentos a demanda,

25 A las 24 horas, se volvió a anestesiarse a los animales y se abrasó suavemente la cicatriz de espesor parcial. Los 40 animales se dividen en cuatro grupos de 10 animales cada uno. Los grupos son los siguientes: Grupo 1- cobayas quemados, abrasados y dejados sin tratar como controles, Grupo II- cobayas quemadas, abrasadas y tratadas con medio no acondicionado el día 1 (día de la abrasión) y el día 7; Grupo III- animales quemados, abrasados y tratados con medio acondicionado de células derivadas del amnios el día 1 y el día 7; Grupo IV- quemados, abrasados y  
30 tratados con una suspensión de células derivadas del amnios durante toda la quemadura y vendados con Adaptic y apósitos de volumen grande. EL vendaje externo se retira suavemente cada cinco días o cuando sea necesario. Los animales reciben premedicación con buprenorfina (0, mg/kg), fueron anestesiados con halotano inhalado y se obtuvieron biopsias de la herida por quemadura todas las semanas hasta el momento de cicatrización. Las muestras de biopsia se seccionan y tiñen y los folículos pilosos se cuentan al microscopio y se expresan como el número por  
35 campo de potencia alto. Adicionalmente se realizan análisis histológicos de la piel en cicatrización. Se realizaron observaciones macroscópicas y se documentaron fotográficamente para determinar la calidad de la cicatrización y la distribución de pelo.

40 Lesiones de quemaduras de espesor parcial (rata normal). Cincuenta ratas macho Sprague-Dawley de 300350 gramos de peso se aclimatan durante una hora antes de usar. Con anestesia interaperitoneal con Nembutal se afeitó y depiló el dorso de las ratas. Se creó una quemadura dorsal de espesor completa de 30 cm cuadrados mediante inmersión en agua en ebullición activa. A cada rata se le administran siete ml de lactato de Ringer mediante inyección subcutánea para evitar la deshidratación. Los animales se enjaulan individualmente y se les ofrece agua y alimentos a demanda. Cinco días después de la quemadura, la cicatriz se debe escindir de los animales  
45 anestesiados y se tienen como resultado una herida granulada. La caracterización histológica de esta herida en comparación con una herida granulada humana se ha realizado antes (Robson MC, y col., J Surg Res 16: 299-306, 1974). Las ratas se dividen en cinco grupos de 10 animales cada uno se les trató del siguiente modo: Grupo I no reciben tratamiento para las heridas y sirven como controles, Grupo II- recibe tratamiento con medio no acondicionado el día 0 (día de la escarectomía) y el día 7; Grupo III- recibe tratamiento con medio medio acondicionado de células derivadas del amnios el día 0 y el día 7; Grupo IV- reciben tratamiento con una suspensión de células derivadas del amnios durante toda la quemadura y se vendan con Adaptic y apósitos de volumen grande. El vendaje se cambia cada cinco días o cuando sea necesario. El Grupo V recibe tratamiento con una matriz extracelular sembrada con células derivadas del amnios y vendados como en el Grupo IV. Las heridas de los animales de los Grupos I-III se dejan sin exponer. Cualquier exudado seco se elimina sin traumatismos antes de  
55 cualquier trazado o biopsia de la herida. Cada 72 horas para las ratas del Grupo I-III, o siempre que sea necesario cambiar los vendajes en los grupos IV y V, las ratas reciben premedicación con buprinorfina (0,1 mg/kg), son anestesiadas con halotano inhalado y los resultados de sus heridas se pueden seguir e las láminas de acetato. Los cálculos del área se realizan usando planimetría digital. Las mediciones en serie se representan frente al tiempo. Para cada dato de cada animal se proporciona una ecuación de Gompertz ( $r_2$  típica= 85). Usando esta curva se estima la semivida de la herida. La comparación entre grupos se realiza usando el análisis de la tabla de la vida y la prueba de rangos de Wilcoxon. El análisis estadístico se realiza usando SAS (SAS/STAT Guide for Personal Computers, Versión 6 Edición, Cary, North Carolina, 1987, pág. 1028) y BMDP (BMDP Statistical Software, Inc. 1988(.. A partir de las curvas de mejor ajuste para las heridas individuales se calcula el número de días requerido para la cicatrización del 25%, 50% y 75% de las heridas originales. Los sitios de biopsia de heridas aleatorizadas se  
60 obtienen de ratas a las que se ha vuelto a anestesiarse los días , 10, 15, 20, y 25 después de la escarectomía o los días 10, 15, 20, 25, y 30 tras la quemadura y se introducen en las soluciones conservantes adecuadas para los  
65

estudios histológicos.

Lesiones de quemaduras de espesor completo (rata inmunológicamente alterada). Cincuenta ratas criadas "desnudas" congénitamente atímicas se adquirieron comercialmente (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN).  
 5 Todos los animales eran macho y pesaban entre 250 y 300 gramos. Por su defecto inmunitario, los animales se enjaulan en instalaciones de barrera sin patógenos, en jaulas con filtros de aire sellados, aisladores de animales, unidades de flujo laminar y cuartos de flujo laminar. Todos los suministros, como alimentos, agua, lechos etc., se esterilizan para prevenir infecciones. En todo momento se usan los procedimientos recomendados en la Guía para la Atención y el Uso de los Ratones Atímicos en Investigación Biomédica (Institute of Laboratory Animal Resources).  
 10 Las personas que manipulan las ratas llevarán gorros, mascarillas, batas estériles, guantes estériles y cubrezapatos. Todas las operaciones con ratas "desnudas" se llevan a cabo con anestesia intraperitoneal con Nembutal, 35 mg/kg de peso corporal, usando técnicas quirúrgicas asépticas. Las operaciones se realizan en una campana biológica de flujo de aire bidireccional. Los instrumentos quirúrgicos se esterilizan en autoclave y los sitios quirúrgicos se preparan con solución de povidona yodada. Los 50 animales se dividen en cinco grupos de 10 animales cada uno.  
 15 La anestesia, analgesia, procedimientos, tratamientos de las heridas y las mediciones son idénticas al modelo de rata intacta descrito anteriormente. La manipulación de los trazados, planimetría y estadística son también los mismos que los descritos anteriormente.

Matriz de colágeno poblada por fibroblastos *in vitro*: Los fibroblastos se preparan como se ha descrito anteriormente en Kuhn, y col. (Kuhn MA, y col., Internat J Surg Invest 2: 467-474, 2001). Las matrices de colágeno se preparan a partir del colágeno de tipo I de la cola de la rata (extraído en ácido acético), como recomienda el fabricante (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) (11). El colágeno sin diluir (1 ml) se introduce en placas de cultivo de 35 mm (Falcon 1008) y se distribuyen uniformemente. Las placas se introducen en una cámara de vapor de amonio durante 3 minutos para solidificar. A las placas de cultivo se añaden agua destilada estéril (5 ml), se deja reposar durante una hora y se aspiran. Esto se repite cuatro veces para eliminar el exceso de amoniaco y las matrices de colágeno se incuban durante 24 horas a 4 °C. Se añade PBS con 1,0 % de suero para sustituir el aspirado final. Se usa una aguja de 18 gauge para desprender las matrices de gel de colágeno de la superficie de las placas de cultivo, de modo que se sueltan y suspenden en solución salina. Se prepara un total de 30 matrices de colágeno para permitir mediciones por quintuplicado basadas en 5 grupos de tratamiento más un control sin tratar. Para formar las FPLC, se aspira toda la solución salina de las placas de cultivo de 35 mm que contienen las matrices. Dos ml de 2 x 10 como fibroblastos/ml se colocan en la superficie de cada una de las matrices de gel de colágeno prefabricadas. Las FPLC se dividen en seis grupos del siguiente modo: El Grupo I se mantiene como control sin tratamiento; Grupo II recibe medio no acondicionado; Grupo III recibe medio acondicionado de células derivadas del amnios; Grupo IV recibe una suspensión de células derivadas del amnios; Grupo V se cubre con una matriz extracelular; y Grupo VI se cubre con una matriz extracelular sembrada con células derivadas del amnios. Las FPLC se incuban a 37°C, 5% de dióxido de carbono. La cantidad de contracción del gel se mide cada 24 horas durante 5 días.

Los excesos de acetato se usan para trazar el área de los geles. Los geles se realizan por quintuplicado (5 geles) para la línea de fibroblastos establecida y se calculan las mediciones usando planimetría digital y el software Sigma Scan (Jandel Scientific, Corte Madera, CA). Cada medición del área de gel de colágeno se convierte para reflejar el porcentaje del área que permanece en el tiempo y, en consecuencia, el porcentaje de la contracción del gel. Se usa un análisis de la varianza de una sola vía para determinar las diferencias significativas entre grupos. Cuando se identifica una diferencia se usa una prueba de Tukey (prueba de comparación múltiple parada) para delinear las diferencias. Se usa el software Sigma Stat statistical para el análisis de datos. Además, las FPLC de 24 horas se examinan al microscopio y se fotografían. Uno de los geles se evalúa para la viabilidad de los fibroblastos el día 5 usando ensayo de exclusión con azul tripán. Otro gel se induce para determinar espectrofotométricamente el número de células como función de la actividad mitocondrial usando el procedimiento MD. Tras la exposición a agentes de prueba, los cultivos de suspensión de cinco días se vuelven a incubar y se exponen a bromuro de [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio o MD. Las deshidrogenasas mitocondriales de los fibroblastos viables escinden el anillo de tetrazolio, que da cristales de formazán de color morado. Estos se disuelven en isopropanol acidificado que tiene como resultado una solución morada que se mide espectrofotométricamente. Cuando incremento o disminución del número de células tiene como resultado un cambio concomitante en la cantidad de formazán formada, lo que indica cualquier grado de toxicidad del material de prueba aplicado. Varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, se pondrán de manifiesto para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios que se realiza mediante el procedimiento de:
- (a) disociar usando una proteasa como reactivo de disociación de las células derivadas del amnios de un amnios aislado de una placenta;
  - (b) recolectar las células derivadas del amnios disociadas; y
  - (c) cultivar las células derivadas del amnios recogidas en medio de cultivo que no contienen materiales derivados de animales distintos a la seroalbúmina humana
- 10 2. La población sustancialmente purificada de la reivindicación 1, en la que las células derivadas del amnios recogidas son negativas para la expresión de marcadores proteicos G090 y G0117.
- 15 3. La población sustancialmente purificada de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las células no están xeno-contaminadas.
- 20 4. La población sustancialmente purificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es una composición expandida de células derivadas del amnios.
5. La composición de la reivindicación 4 que carece de animales.
- 25 6. La composición de la reivindicación 4, en la que las células derivada del amnios forman esferoides.
7. La composición de la reivindicación 4, que tiene una concentración de al menos  $500 \times 10^6$  células derivadas del amnios/g del amnios de partida.
- 30 8. Una composición que comprende medio acondicionado obtenido de la población o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 9. Una composición farmacéutica, que comprende la población o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. La composición de la reivindicación 9 para usar en terapia
11. El uso de la composición de la reivindicación 9 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la cicatrización de heridas o la pérdida de audición en un sujeto que sufre una afección que se beneficiaría del mismo
- 45 12. La composición de la reivindicación 10, para usar en un procedimiento para el tratamiento de la cicatrización de heridas o la pérdida de audición.
13. El uso de la composición de la reivindicación 11 o la composición para usar de la reivindicación 12, en el que la herida se selecciona del grupo constituido por heridas mecánicas, térmicas, agudas, crónicas, infectadas y estériles.
- 50 14. Una preparación cosmética que comprende una población o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
15. Un procedimiento de obtener una población sustancialmente purificada de células derivadas del amnios que comprende las etapas de
- (a) disociar usando una proteasa como reactivo de disociación de las células derivadas del amnios de un amnios aislado de una placenta;
  - (b) recolectar las células derivadas del amnios disociadas; y
  - (c) cultivar las células derivadas del amnios recogidas en medio de cultivo que no contienen materiales derivados de animales distintos a la seroalbúmina humana
- 55 16. La población sustancialmente purificada de la reivindicación 1, que además es negativa para la expresión de telomerasa.
- 60



Figura 1

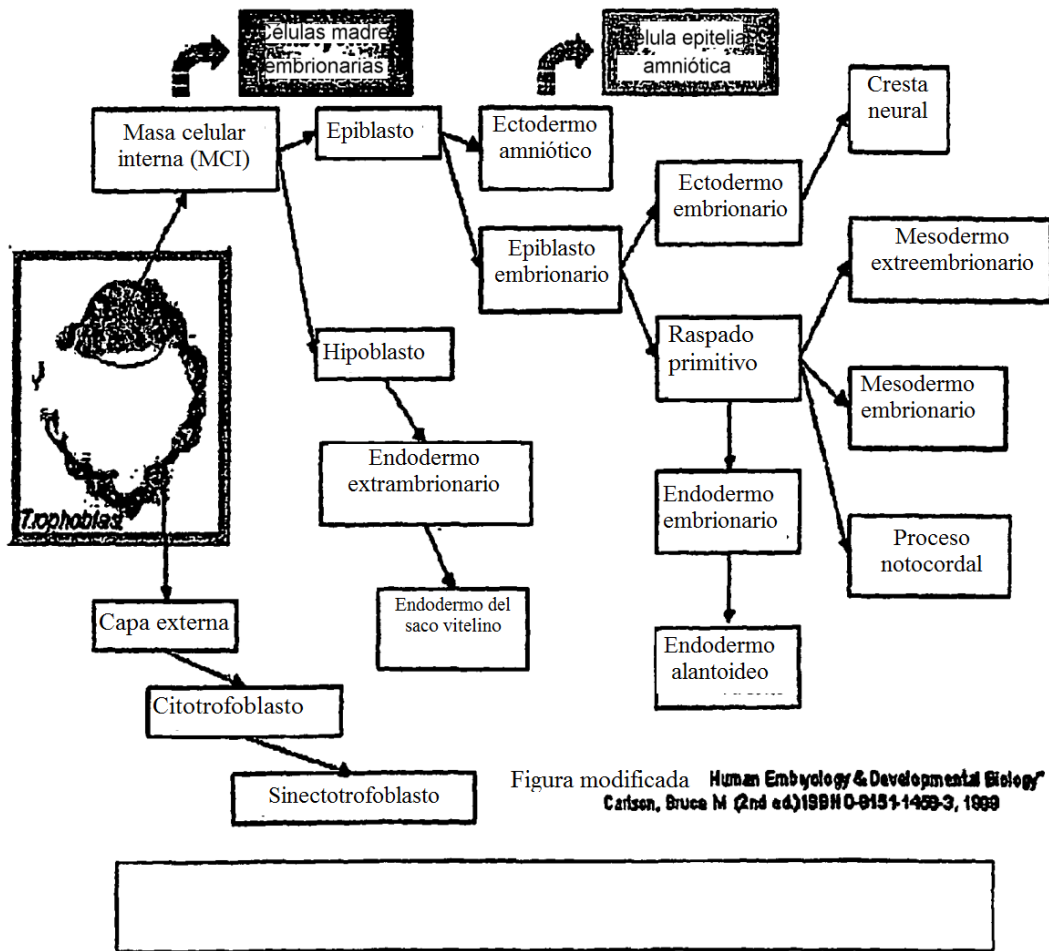


Figura modificada *Human Embryology & Developmental Biology*  
Carlson, Bruce M (2nd ed) ISBN 0-8151-1453-3, 1993

Figura 2

