

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 729**

51 Int. Cl.:

A61K 35/50 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08789856 .5**

96 Fecha de presentación: **02.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2200622**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54

Título: **Células adherentes de tejidos adiposos o placenta y uso de las mismas en terapia**

30

Prioridad:

19.09.2007 US 960184 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

13.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

13.12.2012

73

Titular/es:

**PLURISTEM LTD. (100.0%)
MATAM BUILDING 20
31905 HAIFA, IL**

72

Inventor/es:

**MEIRON, MORAN;
TOREN, AMIR;
OFIR, RACHEL;
ABERMAN, ZAMI y
DRORI-CARMI, NIRIT**

74

Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 729 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

Células adherentes de tejidos adiposos o placenta y uso de las misma en terapia

Campo y antecedentes de la invención

5 La invención se refiere a métodos de tratamiento de enfermedades que usan células adherentes de tejidos adiposos o placenta, más concretamente, a métodos de tratamiento de isquemia y/o afecciones médicas que requieren la regeneración y/o reparación de tejido conectivo usando las células adherentes.

10 En el mundo médico en desarrollo existe una necesidad cada vez mayor de grandes cantidades de células madre adultas con el propósito de injerto celular e ingeniería tisular. Además, la terapia de célula madre adulta está continuamente en desarrollo para tratar y curar diversas afecciones tales como trastornos hematopoyéticos, enfermedad del corazón, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, vagos, distrofia muscular, trastornos autoinmunes, diabetes y artritis.

15 En años se ha enfocado recientes, una actividad considerable en el potencial terapéutico de las células estromales mesenquimales (MSCs, del Inglés "Mesenchymal Stromal Cells") para diversas aplicaciones médicas incluyendo la reparación de órganos dañados tales como cerebro, corazón, hueso e hígado y en soporte de los trasplantes de médula ósea (BMT, del Inglés "Bone Marrow Transplantations"). Las MSCs, una población heterogénea de células obtenidas de, por ejemplo, médula ósea, tejido adiposo, placenta y sangre son capaces de diferenciarse en diferentes tipos de tejidos de células maduras mesenquimales (por ejemplo, células endoteliales reticulares, fibroblastos, adipocitos, células precursoras osteogénicas) dependiendo de las influencias de diversos factores bioactivos. Por consiguiente, las MSCs han sido ampliamente estudiadas en la medicina regenerativa como base para construir nuevos tejidos tales como hueso, cartilago y grasa para la reparación de lesión o reemplazamiento de tejidos patológicos y como tratamiento para enfermedades genéticas y adquiridas [Fibbe y Noort, Ann. N.Y. Acad. Sci. (2003) 996:235-44; Hortwitz et al., Cytotherapy (2005) 7(5):395; Zimmet y Hare, Basic Res. Cardiol (2005) 100(6):471-81]. Además, la capacidad multipotente de MSCs, su fácil aislamiento y cultivo, así como su alto potencial de expansión *ex vivo* hace de ellas una herramienta terapéutica atractiva [Fibbe y Noort, supra; Minguell et al. Exp. Biol. Med. (Maywood)(2001) 226(6):507-20].

25 Las MSCs derivadas placentarias presentan muchos marcadores comunes a las MSCs aisladas de otros tejidos, por ejemplo, CD105, CD73, CD90 y CD29, y la falta de expresión de marcadores celulares específicos hematopoyéticos, endoteliales y trofoblásticos. Se han alcanzado la diferenciación adipogénica, osteogénica y neurogénica después de cultivar MSCs derivadas placentarias bajo condiciones apropiadas [Yen et al., Stem Cells (2005) 23(1):3-9]. Además, se ha demostrado que las MSCs aisladas de placenta y cultivadas *in vitro* son inmune privilegiadas de una manera similar a MSCs. Por tanto, la placenta proporciona una fuente éticamente no controvertida y fácilmente accesible de MSCs para aplicaciones experimentales y clínicas [Zhang et al., Exp Hematol (2004) 32(7):657-64].

30 Los presentes inventores han ideado previamente condiciones de cultivo tridimensionales (3D) adecuadas para la expansión de las MSCs derivadas placentarias (WO 2007/108003)

Destacados usos clínicos de MSCs se resumen a continuación.

35 Isquemia

Enfermedad arterial periférica (PAD)

40 La enfermedad arterial periférica (PAD, del Inglés "Peripheral arterial disease") es una enfermedad crónica que progresivamente restringe el flujo sanguíneo en los miembros que puede conducir a serias complicaciones médicas. Esta enfermedad con frecuencia está asociada con otras afecciones clínicas, que incluyen hipertensión, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, diabetes, obesidad y apoplejía. La isquemia de Miembro Crítica (CLI, del Inglés "Critical Limb Ischemia") se usa para describir pacientes con isquemia crónica inducida por dolor, úlceras, pérdida de tejido o gangrena en el miembro. La CLI representa la fase final de pacientes con PAD quienes necesitan tratamiento exhaustivo mediante un cirujano vascular o especialista vascular. A diferencia de la enfermedad de arteria coronaria y cerebral, la enfermedad arterial periférica (PAD) mantiene una condición poco apreciada que a pesar de ser seria y extremadamente prevalente raramente se diagnostica e incluso menos frecuentemente se trata. Por consiguiente, CLI conduce con frecuencia a que la amputación o los índices de muerte y mortalidad en pacientes de PAD excedan a la de los pacientes con infartos miocárdicos y apoplejía.

50 En intentos para tratar las afecciones isquémicas, se han usado diversas células madre adultas. Por tanto, el cultivo conjunto de células estromales derivadas (ADSC, del Inglés "Adipose Derived Stromal Cells") de tejido adiposo y células endoteliales (EC, del Inglés "Endothelial Cells") dieron como resultado un aumento significativo en la viabilidad de EC, migración y formación de tubo principalmente a través de la secreción de VEGF y HGF. Cuatro semanas después del

trasplante de células estromales dentro del miembro trasero de ratón isquémico se mejoraron los resultados angiogénicos [Nakagami et al., J. Atheroscler Thromb (2006) 13(2):77-81]. Moon et al. [Cell Physiol Biochem. (2006) 17:279-90] han ensayado la capacidad de células progenitoras derivadas de tejido adiposo (ADSC) para tratar isquemia de miembro en ratones inmunodeficientes y demostraron un aumento significativo en el índice de perfusión con láser Doppler en grupo trasplantado con ADSC.

Además, cuando se trasplantaron las células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical (UCB, del Inglés "Umbilical Cord Blood") dentro de cuatro hombres con enfermedad de Buerger quienes ya han recibido tratamiento médico y terapias quirúrgicas, el dolor de resto isquémico, desaparecido de pronto de sus extremidades afectadas [Kim et al., Stem Cells (2006) 24(6):1620-6]. Además, el trasplante de células madre mesenquimales humanas aisladas de membranas fetales de placenta a término (FMhMSC) dentro de corazones de ratas infartados se asoció a densidad capilar aumentada, normalización de la función ventricular izquierda y disminución significativa en el tejido de cicatriz, el cual se aumentó cuando se acondicionaron previamente las células madre con un éster mezclado de hialuronano con ácido butírico y retinóico [Ventura et al., (2007) J. Biol. Chem., 282:14243-52].

Apoplejía

La apoplejía es una de las causas destacadas de muerte alrededor del mundo, causando aproximadamente el 9% de todas las muertes y consumiendo aproximadamente 2-4% de los costes totales de los cuidados sanitarios. Aunque ha habido una reducción constante en la mortalidad por apoplejía en los países desarrollados, probablemente debido al control mejorado de los factores de riesgo de apoplejía (especialmente la alta presión sanguínea, diabetes y fumar cigarrillos), la apoplejía conduce aún a daño permanente (por ejemplo, daño tisular, daño neurológico).

Los nuevos regímenes de tratamiento para la apoplejía incluyen terapia con célula madre. El trasplante de células madre o progenitoras en el sitio lesionado, o bien localmente o vía rutas intravenosas, para reemplazar las células no funcionales, el aumento de la proliferación y/o diferenciación de células madre endógenas o progenitoras y el suministro de moduladores inmunes necesarios se ha contemplado y se mantiene como la principal estrategia basada en célula. Las fuentes potenciales de células madre/progenitoras para la apoplejía incluyen células madre neurales fetales, células madre embrionarias, células neuroteratocarcinoma, células madre no hematopoyéticas derivadas de la sangre del cordón umbilical, células madre derivadas de médula ósea y células madre mesenquimales derivadas de placenta [Andres et al., Neurosurg Focus (2008) 24(3-4):E16].

En un estudio reciente, Koh et al. [Koh et al., Brain Res. (2008)] examinó los efectos neuroprotectores y los mecanismos de células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical humano implantados (hUC-MSCs) en un modelo de rata de apoplejía isquémica. Veinte días después de la inducción de la diferenciación neuronal *in vitro*, hUC-MSCs manifestaron rasgos morfológicos de neuronas y expresaron marcadores celulares neuronales y factores neuronales (por ejemplo, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, factor neurotrófico derivado de cerebro). Además, el implante *in vivo* de las hUC-MSCs dentro del hemisferio dañado de las ratas con apoplejía isquémica inmunosuprimidas mejoró la función del comportamiento neuronal y redujo el volumen de infarto relativo a las ratas control. Tres semanas después del implante, las hUC-MSCs estaban presentes en el hemisferio dañado y expresaron marcadores específicos a neuronas, sin embargo estas células no llegaron a ser células neuronales funcionalmente activas.

Aplicaciones ortopédicas

Diversas afecciones y patologías requieren regeneración y/o reparación del tejido conectivo (por ejemplo, hueso, tendón y ligamento). Estos incluyen, por ejemplo, fracturas de hueso, vagos, herida de quemadura, herida profunda, hueso degenerado, diversos cánceres asociados con pérdida de tejido conectivo (por ejemplo, cáncer de hueso, osteosarcoma, metástasis de hueso) y defecto de cartílago articular.

Se ha descrito el uso de BM-MSCs autólogos para aumentar la curación ósea para aplicaciones ortopédicas veterinarias y humanas e incluyen inyección percutánea de la médula ósea para la curación de ligamento (Carstanjen et al., 2006), tratamiento de defectos óseos mediante autoinjertos o aloinjertos de la médula ósea en la clínica ortopédica (Horwitz et al., 1999, Horwitz et al., 2002), regeneración del defecto óseo de tamaño crítico en perros usando MSCs de médula ósea alogénicas [Arinze TL, et al., J. Bone Joint Surg. Am. 2003, 85-A(10):1927-35] o autólogas [Bruder SP, et al., J. Bone Joint Surg Am. Julio de 1998; 80(7):985-96] cargadas sobre cilindros de cerámica que consisten en fosfato de tricalcio de hidroxapatita, o en conejo usando MSCs derivadas de sangre periférica alogénicas (Chao et al., 2006), y la formación extensa de hueso usando implante de MSCs en babuino (Livingston et al., 2003).

Dentro del campo ortopédico equino, se han usado experimentalmente células madre mesenquimales de BM y fuentes adiposas para el tratamiento quirúrgico de quistes óseos subcondrales, reparar fractura de hueso [Kraus y Kirker-Head, Vet Surg. (2006) 35(3):232-42] y reparar cartílago [Brehm et al., Osteoarthritis Cartilage (2006) 14(2):1214-26; Wilke et al., J. Orthop. Res. (2007) 25(7): 913-25] y clínicamente en el tratamiento de lesiones de tendones en caballos inducidas por sobrecarga. Además, se han usado las diferentes aproximaciones terapéuticas para promover la curación de

ligamento suspensorio en caballos (Herthel, 2001). Herthel (2001) ha demostrado una novedosa aproximación biológica para facilitar la curación de ligamento suspensorio que implica la inyección intralesional de células madre autólogas y componentes asociados de la médula ósea para estimular la regeneración natural del ligamento.

5 Los modelos de conejo para tendones lesionados mostraron que los tejidos tratados con MSC eran más fuertes y rígidos que los tejidos reparados naturales (Gordon et al., 2005). Además, la siembra de MSCs cultivadas dentro de un hueco del tendón dio como resultado biomecanismos de reparación significativamente mejorados (Young et al., 1998, Osiris Therapeutics, www.osiris.com).

10 Se ensayaron Condrosarcoma de Osiris (Células Madres Mesenquimales adultas) en pacientes para evaluar la seguridad y la eficacia. En animales tratados con MSC, se regeneró tejido de menisco separado quirúrgicamente, se protegió la superficie de cartílago, y se observó daño de articulación disminuido en comparación con los animales control. Estos beneficios persisten en modelos animales al menos un año entero (Osiris Therapeutics, www.osiris.com).

Compendio de la invención

15 Algunas realizaciones de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de la isquemia en un sujeto en necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de células adherentes de un tejido seleccionado del grupo que consiste en una placenta y un tejido adiposo, tratando de ese modo la isquemia en el sujeto.

20 Algunas realizaciones de la presente invención se pueden usar para tratar una afección médica que requiere de la regeneración y/o reparación de tejido conectivo en un sujeto en necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes de un tejido seleccionado entre el grupo que consiste en una placenta y un tejido adiposo, tratando de ese modo la afección médica que requiere de regeneración y/o reparación del tejido conectivo en el sujeto.

Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un uso de células adherentes a partir de un tejido seleccionado entre el grupo que consiste en una placenta y un tejido adiposo para la producción de un medicamento identificado para tratar la isquemia.

25 Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un uso de células adherentes a partir de un tejido seleccionado entre el grupo que consiste en una placenta y un tejido adiposo para la producción de un medicamento identificado para tratar una afección médica que requiere de regeneración y/o reparación de tejido conectivo.

30 Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un artículo de producción que comprende un material de envasado el cual comprende una etiqueta para usarse en el tratamiento de isquemia, envansando el material de envasado una cantidad farmacéuticamente efectiva de células adherentes de un tejido seleccionado entre el grupo que consiste en una placenta y un tejido adiposo.

35 Algunas realizaciones de la presente invención han proporcionado un artículo de producción que comprende un material de envasado el cual comprende una etiqueta para usarse en el tratamiento de una afección médica que requiera la regeneración y/o reparación de tejido conectivo, envansando el material de envasado una cantidad farmacéuticamente efectiva de células adherentes de un tejido seleccionado entre el grupo que consiste en una placenta y un tejido adiposo.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes son capaces de suprimir la reacción inmune en el sujeto.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, al menos el 10% de las células adherentes están en una fase proliferativa.

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la isquemia es la enfermedad arterial periférica (PAD).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la enfermedad arterial periférica (PAD) es isquemia crítica de miembro (CLI).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la isquemia comprende isquemia del sistema nervioso central (CNS, del Inglés "Central Nervous System").

45 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la isquemia está seleccionada entre el grupo que consiste en enfermedad arterial periférica, enfermedad vascular isquémica, enfermedad del corazón isquémica, enfermedad del cerebro isquémica, enfermedad renal isquémica y placenta isquémica.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes se obtienen a partir de un cultivo

tridimensional (3D).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo tridimensional (3D) comprende un biorreactor 3D.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células en el cultivo 3D se efectúa bajo perfusión.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones de cultivo del cultivo tridimensional comprende un material adherente seleccionado entre el grupo que consiste en un poliéster y un polipropileno.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células se efectúa durante al menos 3 días.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células se efectúa hasta que al menos el 10% de las células están proliferando.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden una expresión de marcador positivo seleccionado entre el grupo que consiste en CD73, CD90, CD29 y CD105.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden una expresión de marcador negativo seleccionado entre el grupo que consiste en CD3, CD4, CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34 y CD79.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden un perfil de expresión esencialmente como el descrito en la presente memoria.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden células que comprenden un fenotipo de célula madre estromal.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el fenotipo de la célula madre estromal comprende actividad de supresión de célula T.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el tejido conectivo comprende tendón, hueso y/o ligamento.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la afección médica que requiere regeneración y/o reparación de tejido conectivo se selecciona entre el grupo que consiste en fractura de hueso, cáncer de hueso, herida de quemadura, defecto de cartílago articular y herida profunda.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la afección médica se selecciona entre el grupo que consiste en un quiste de hueso subcondral, una fractura de hueso, una osteoporosis, una osteoartritis, un hueso degenerado, un cáncer de hueso, un daño de cartílago, un defecto de cartílago articular, una enfermedad de disco degenerativa, una osteogenesis imperfecta (OI), una quemadura, una herida de quemadura, una herida profunda, un curación retrasada de herida, un tendón lesionado y un ligamento lesionado.

30 Al menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente invención tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque se pueden usar los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayando la invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, la especificación de patente, que incluye definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no intentan ser limitantes.

35 **Breve descripción de los dibujos**

La invención está descrita en la presente memoria, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos acompañantes. Ahora con referencia específica a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que las particularidades mostradas están a modo de ejemplo y con el propósito de una discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención solamente, y se presentan con el motivo de facilitar que se crea que es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En ese aspecto, ningún intento se realiza de mostrar los detalles estructurales de la invención en más detalle que lo necesario para un entendimiento fundamental de la invención, la descripción tomada que se hace aparente con los dibujos para los expertos en la técnica como las diversas formas de la invención se pueden realizar en la práctica.

En los dibujos:

45 FIGs. 1A-G representan el microambiente similar a hueso creado en el sistema del biorreactor que contiene vehículos 3D. Las Figuras 1A-B son micrográficos de electrones que representan la comparación del hueso natural (Figura 1A) y la

- estructura del vehículo 3D PluriX™ 7 días después de sembrar las células adherentes, imitando el microambiente de hueso (Figura 1B). Las figuras 1C-F son micrográficas de electrones que representan la matriz 3D PluriX™ sembrada con célula adherente, producida de la médula ósea, 20 días (Figuras 1C-D, aumentadas x150 y 250 respectivamente) y 40 días (Figuras 1E-F, aumentadas x350 y 500 respectivamente) después de la siembra. La Figura 1G es un diagrama del biorreactor de flujo de pistón 3D Plurix con partes separadas definidas por números: el depósito de medio de cultivo (1), suministro de mezcla de gas (2), filtro (3), punto de inyección (4), columna en la cual se colocan los vehículos 3D (5), monitor de flujo (6), válvula de flujo (6a), recipiente de separación (7), analizadores del crecimiento celular (8); bomba peristáltica (9), punto de muestreo (10), electrodo de medida de O₂ disuelto (11), electrodo de medida de pH (12), sistema de control (13), medios de crecimiento frescos (14), medios de crecimiento usados (15).
- 5
- 10 FIG. 2 es un gráfico que representa diferentes lotes de producción de células adherentes (Lotes 5-8) que se originan de placenta, crecidas en condiciones de crecimiento 3D dentro de los sistemas de biorreactor. Las células adherentes (2×10^6) se sembraron en el biorreactor a una densidad de 10.000-15.000 células/un vehículo. Después de un cultivo de 12 días las células adherentes 3D alcanzaron una densidad de entre 150.000-250.000 células/vehículo o $22,5-37,5 \times 10^6$ en un biorreactor que contenía 150 vehículos.
- 15
- 20 FIGs. 3A-B son gráficos de barra que representan diferencia en los niveles de expresión de marcadores de membrana expresados en célula adherente 3D derivada de placenta (morado oscuro) en comparación con los marcadores de membrana en células de placenta cultivadas en condiciones de cultivo 2D convencionales (morado clarito). Se hicieron crecer las células adherentes durante 4-6 semanas en matraces (2D) o durante 2-3 semanas en el sistema de biorreactor, sobre vehículos de poliestireno (3D). Después de recoger de o bien los matraces o vehículos, las células se incubaron y se unieron a un panel de anticuerpos monoclonales (MAb), las cuales reconocen los marcadores de membrana característicos de las células adherentes (Figuras 3A), o células hematopoyéticas (Figuras 3B). Tomar nota de la expresión significativamente mayor de marcadores de membrana de MSC en células cultivadas en 2D que la mostrada por los marcadores de membrana CD90, CD105, CD73 y CD29, en comparación con los marcadores de membrana de MSC expresados en las células adherentes cultivadas en 3D, especialmente CD105 el cual mostró 56% de expresión en células cultivadas en 3D frente al 87% en células cultivadas en 2D (Figura 3A). Las células adherentes de cultivos tanto en 2D como en 3D, no expresaron ninguno de los marcadores de membrana hematopoyéticos (Figura 3B).
- 25
- 30 FIGs. 4A-D son gráficos de barra que representan una comparación de niveles de proteína en células adherentes producidas de la placenta cultivada bajo condiciones 2D y 3D o en medios acondicionados igual. Las Figuras 4A-C representan los niveles del ligando Flt-3 (Figura 4A), IL-6 (Figura 4B) y SCF (Figura 4C) en pg/ml, normalizados para 1×10^6 células/ml, analizado por ELISA, en los medios acondicionados de células adherentes cultivadas en 2D y 3D. Los resultados representan uno de tres experimentos independientes. La Figura 4D muestra los niveles de expresión de proteínas celulares diferentes, analizados por espectrometría de masa con muestras de proteína marcadas con reactivos iTRAQ comparadas entre las mismas. Las muestras de proteína se tomaron de células adherentes crecidas bajo condiciones 2D (barras blancas) y 3D (barras grises). La figura representa uno de dos experimentos réplica. Tomar nota de la diferencia en el nivel de expresión de alguna de las proteínas en las células y medios acondicionados de condiciones de cultivo 2D y 3D.
- 35
- 40 FIGs. 5A-D son micrográficas que representan la capacidad de diferenciación *in vitro* de célula adherente 3D derivada de placenta a osteoblastos. Se cultivaron células adherentes derivadas de placenta humana en un medio de inducción osteogénico (DMEM que contenía FCS al 10%, dexametasona 100 nM, 2-fosfato de ácido ascórbico 0,05 mM, B-glicerofosfato 10 mM) durante un periodo de 3 semanas. Las Figuras 5A-B muestran células que expresan matriz calcificada, tal como se indica mediante tinción con Rojo Alizarina S.
- Las Figuras 5C-D muestran las células control, las cuales no fueron tratadas con medio de inducción osteogénico y mantuvieron un fenotipo similar a fibroblasto y que demostraron no mineralización.
- 45
- 50 FIG. 6 es un gráfico que representa el porcentaje de células CD45+ humanas detectadas en médula ósea (BM) de ratones NOD-SCID, tratados con quimioterapia (inyecciones intraperitoneales de busulfan de 25 mg/kg durante dos semanas consecutivas) 3,5 semanas después del trasplante. Se trasplantaron sólo células CD34+ (100.000) purificadas a partir de células mononucleares derivadas de sangre del cordón (5 ratones, a) o se trasplantaron conjuntamente con $0,5 \times 10^6$ células adherentes derivadas de placenta en condiciones 2D (célula adherente 2D; 2 ratones, b), o células adherentes derivadas de placenta en condiciones 3D (célula adherente 3D), en el biorreactor pluriX™ (5 ratones, c). A continuación, se recogió la BM de los fémures y las tibias de los ratones. Las células humanas en la BM se detectaron mediante citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de células humanas que expresan CD45 mediante incubación de células con anti CD45-FITC humano. Tomar nota de porcentaje superior de células humanas (hCD45+) en la médula ósea de ratones trasplantados conjuntamente con célula adherente 2D (b) así como con célula adherente 3D (c) en comparación con el porcentaje de las células humanas en los ratones tratados con sólo HSCs (a). Un mayor injerto visto en ratones tratados con células cultivadas con célula adherente 3D en comparación con ratones tratados con células
- 55

cultivadas con célula adherente 2D indica una mayor ventaja terapéutica única en células adherentes cultivadas en 3D.

FIGs. 7A-B son análisis FACS de células humanas CD45+ de injerto en ratones trasplantados sólo con células CD34+ (Figuras 7A) en comparación con células CD34+ junto con células adherentes derivadas de tejido adiposo (Figura 7B). Tomar nota del significativamente mayor porcentaje de población hematopoyética humana (hCD45+)(7A – 29%) en un ratón trasplantado conjuntamente con célula adherente derivada de tejido adiposo en comparación con un ratón tratado solo con CD34+ humana (7B-12%).

FIG. 8A es un gráfico de barras que representa una reacción de linfocito mezclado conducida entre células mononucleares de sangre de cordón humano (CB, del Inglés “Cord Blood”), y cantidades iguales de células de sangre de cordón irradiadas (iCB) (3.000 Rad), los monocitos derivados de sangre periférica humana (PBMC, del Inglés “Peripheral Blood Monocytes”), células adherentes derivadas placentarias cultivadas en 2D (2D) o cultivadas en 3D (3D), o una combinación de PBMC y células adherentes derivadas placentarias cultivadas en 2D y 3D (PBMC+2D y PBMC+3D). El tamaño de la población celular CB está representada por la absorción de ³H-timidina (medida en CPM) la cual se midió durante las últimas 18 horas de cultivo. La elevación en la proliferación estimulada de célula CB indica una respuesta inmune de un nivel superior. Tomar nota del nivel inferior de respuesta inmune presentado por células incubadas con células adherentes y, en particular, la reducción de la respuesta inmune de CB a PBMCs cuando se incuban conjuntamente con las células adherentes. Se realizaron tres réplicas de cada reacción.

FIG. 8B es un diagrama de flujo que representa la producción de célula adherente 3D a partir de placentas por Celligen™ (designadas células PLX-C).

FIG. 8C es un diagrama de un vaso de biorreactor Celligen™ y puertos adaptados a partir del sitio web de “The New Brunswick Scientific”.

FIGs. 9A-B representa el análisis del ciclo celular de la producción de células adherentes 3D por Plurix (designadas PLX, Figura 9B) y por Celligen (designadas PLX-C, Figura 9A). Las células se fijaron en EtOH O.N. al 70%, se centrifugaron y resuspendieron en una disolución de Yoduro de Propidio (PI) y se analizaron mediante FACS.

FIGs. 10A-C representan la expresión de marcadores típicos de fibroblasto pero no la expresión de marcadores típicos endoteliales sobre PLX-C. La Figura 10A representa la expresión negativa del marcador endotelial CD31; la Figura 10B representa la expresión negativa del marcador endotelial KDR; y la Figura 10C representa la expresión positiva del marcador de fibroblasto humano (D7-FIB). Tomar nota, los histogramas rojos para el isotipo IgG1 (FITC) representan el control negativo mientras que los histogramas azules representan las células teñidas positivamente.

FIGs. 11A-D representan la expresión de moléculas estimuladoras y coestimuladoras sobre células PLX-C. La Figura 11A representa la expresión de PLX-C de CD80; la Figura 11B representa la expresión de PLX-C de CD86; la Figura 11C representa la expresión de PLX-C de CD40; y la Figura 11D representa la expresión de PLX-C de HLA-A/B/C. Los controles negativos se prepararon con moléculas de fluorescencia de isotipo relevante. Tomar nota, los histogramas rojos indican la población de células que expresan marcador de PLX-C, los histogramas azules indican la población de células que expresan marcador de médula ósea (BM) y los histogramas verdes indican la población de células que expresan marcador de célula mononuclear (MNC, del Inglés “Mononuclear Cell”).

FIGs. 12A-B representan la inhibición de la proliferación de linfocito por PLX-C. La Figura 12A representa los ensayos de MLR realizados con 2×10^5 MNC (donante A) derivadas de sangre periférica (PB, del Inglés “Peripheral Blood”) estimuladas con igual cantidad de MNCs (donante B) derivadas de PB irradiadas (3.000 Rad) seguido de la adición de cantidades aumentadas de células PLX-C a los cultivos. Se sembraron tres réplicas de cada grupo en placas de 96 celdas. Se midió el índice de proliferación mediante incorporación de [³H]timidina; la Figura 12B representa MNCs derivadas de sangre periférica (PB) estimuladas con ConA (1,5 mg/ml). Se añadieron cantidades aumentadas de células PLX-C a los cultivos. Se sembraron tres réplicas de cada grupo en placas de 96 celdas. Se midió el índice de proliferación mediante incorporación de [³H]timidina.

FIGs. 13A-C representan la regulación de PLX-C de la secreción de citoquina proinflamatoria y antiinflamatoria después del cultivo conjunto con células de sangre periférica. Las Figuras 13A-B representan secreción de IFN γ (Figura 13A) y TNF α (Figura 13B) después del cultivo conjunto de MNCs derivadas humanas (aisladas a partir de sangre periférica) estimuladas con ConA con PLX-C; la Figura 13C representa la secreción de IFN γ , TNF α y IL-10 después del cultivo conjunto de MNCs derivadas humanas (aisladas a partir de la sangre periférica) estimuladas con LPS con PLX-C. Se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a análisis de citoquinas usando ELISA.

FIG. 14 representa el vector de expresión de luciferasa usado para infectar células PLX-C infectadas. En la presente memoria se usó el vector de expresión Lv33 de OmicsLink. Se clonó el gen de luciferasa dentro de ORF.

FIG. 15 representa la alta expresión de luciferasa por células PLX-C. Las células se infectaron con el vector de expresión

de luciferasa y se visualizó mediante el sistema IVIS 48 horas después de la infección. Tomar nota, las células presentaron altos niveles de expresión de luciferasa.

5 FIGs. 16A-D representan la inyección de 2×10^6 células PLX-C que expresan luciferasa en ratones SCID/Beige. Se inyectó un ratón IM y uno IV. Se hizo un seguimiento de los ratones inyectados usando el sistema IVIS para valorar la biodistribución *in vivo* de PLX-C. Se representaron los resultados de IVIS del día 1 (Figura 16A), día 4 (Figura 16B), día 6 (Figura 16C) y día 22 (Figura 16D).

10 FIG. 17 es una gráfica que representa la perfusión aumentada en cadera y pie de ratones tratados con las células adherentes de la invención (designadas PLX-C). La figura representa la media del porcentaje de perfusión en la cadera y pie de ratón. Se midieron los flujos sanguíneos sobre la cadera y el pie usando un láser Doppler de no contacto desde ambos lados en los días 0, 6, 9, 14 y 21 después de la operación (lo mostrado son medidas en el día 21). Los resultados se expresaron como la relación entre el flujo sanguíneo en el miembro isquémico y en el miembro normal durante el experimento.

15 FIG. 18 es un gráfico que representa la valoración de la función del miembro y el daño isquémico. Se realizó la valoración semicuantitativa del uso defectuoso del miembro isquémico en serie usando el siguiente sistema de marcación: 3=arrastre del pie, 2=no arrastre pero no flexión plantar, 1=flexión plantar y 0=flexionar los dedos para resistir el agarre suave de la uña.

20 FIGs 19A-C representan la densidad capilar aumentada después del tratamiento con PLX-C. La Figura 19A representa la densidad capilar en ratones tratados con PBS; la Figura 19B representa la densidad capilar en ratones tratados con células PLX-C; la Figura 19C es un gráfico de barras que representa el número de capilares por células musculares. Tomar nota, se anotó el aumento de la densidad capilar en ratones tratados con PLX-C pero no en ratones control, después la isquemia de miembro inducida se demostrara mediante tinción de capilaridad específica.

25 FIGs. 20A-B representan estrés oxidativo reducido e inflamación endotelial después de la administración de PLX-C. La Figura 20A es un gráfico de barras que representa el estrés oxidativo (tinción de Nitrotirosina); y la Figura 20B es un gráfico de barras que representa la inflamación endotelial (evaluación VCAM). Tomar nota, el estrés oxidativo reducido y la inflamación endotelial se anotan en ratones tratados con PLX-C.

Descripción de las realizaciones de la invención

La invención se refiere al aumento de la angiogénesis en un tejido y al tratamiento de isquémica o afecciones médicas que requieren de regeneración y/o reparación de tejido conectivo usando células adherentes de placenta o tejidos adiposos.

30 Los principios y la operación de la invención se pueden entender mejor en referencia a los dibujos y descripciones acompañantes.

35 Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, hay que entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles descritos en la siguiente descripción o ejemplificados por los **Ejemplos**. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de diversos modos. También, hay que entender que la fraseología y la terminología empleada en la presente memoria están con el propósito de descripción y no deberían ser consideradas como limitantes.

Mientras se reduce la invención a la práctica, los presentes inventores han revelado que las células adherentes de una placenta o tejido adiposo son altamente eficientes en el aumento de la angiogénesis en un tejido y en el tratamiento de isquemia y afecciones médicas que requieren de regeneración y/o reparación de tejido conectivo.

40 Tal como se ilustra a continuación en la presente memoria y en el **Ejemplo** 1-8 de la sección Ejemplos la cual viene a continuación, los presentes inventores fueron capaces de desarrollar células adherentes derivadas de adiposo y placenta las cuales comprenden propiedades de células madre estromales. Por consiguiente, las células desarrolladas se encontraron viables, después de la criopreservación, como se evidenció por ensayos de adherencia y repoblación (véase **Ejemplo** 1). El análisis de citometría de flujo de las células adherentes derivadas de placenta revelaron un patrón de expresión de marcador definido (véase las Figuras 3A-B). Tal como se muestra además en el **Ejemplo** 6 de la sección Ejemplos la cual viene a continuación, el implante de células adherentes derivadas placentarias indujo significativamente el flujo sanguíneo en la cadera y pie (Figura 17) de los ratones sometidos a la ligadura de arteria (modelo de miembro trasero isquémico), mejorando la función del miembro significativamente (Figura 18), aumentaron la densidad capilar (Figuras 19A-C) y redujeron el estrés oxidativo e inflamación endotelial (Figuras 20A-B).

50 Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a aumentar la angiogénesis en un tejido efectuada al poner en contacto el tejido con células adherentes de un tejido seleccionado entre el grupo que consiste en una placenta y un tejido

adiposo, aumentando de ese modo la angiogénesis en el tejido.

Tal como se usa en la presente memoria la frase “aumento de la angiogénesis en un tejido” se refiere a aumentar (induciendo, regulando por incremento) el proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos capilares en un tejido.

5 Tal como se usa en la presente memoria la frase “células adherentes” se refiere a una población homogénea o heterogénea de células que son dependientes de anclaje, es decir, requieren unión a una superficie para crecer *in vitro*

Tal como se usa en la presente memoria la frase “tejido adiposo” se refiere a un tejido conectivo que comprende células grasas (adipocitos).

10 Tal como se usa en la presente memoria el término “tejido de placenta” se refiere a una porción del órgano femenino de mamífero que cubre la pared uterina y durante el embarazo envuelve al feto, al cual está unido por el cordón umbilical. Después del nacimiento, la placenta se expulsa (y se refiere como una placenta post parto). En una realización ilustrativa, placenta se refiere a toda la placenta.

Las células adherentes derivadas de placenta o tejido adiposo se pueden propagar usando condiciones de cultivo bidimensionales o tridimensionales.

15 Las condiciones para la propagación de las células adherentes en el cultivo 2D se describen más a continuación en la presente memoria y en la sección Ejemplos que sigue.

20 Tal como se usa en la presente memoria la frase “el cultivo tridimensional” se refiere a un cultivo en el cual se disponen las células a condiciones que son compatibles con el crecimiento celular mientras permite que las células crezcan en más de una capa. Es bien apreciado que el ambiente *in situ* de una célula en un organismo (o un tejido) vivo está en una arquitectura tridimensional. Las células están rodeadas de otras células. Ellas están sostenidas en una red compleja de fibras a nanoescala de matriz extra celular que permite el establecimiento de diversos microambientes locales. Sus ligandos extra celulares no median solamente la unión a la membrana basal sino también el acceso a una diversidad de vasos vasculares y linfáticos. Oxígeno, hormonas y nutrientes son transportados a las células y se arrastran fuera los productos de desecho. Las condiciones en el cultivo tridimensional de la invención son diseñadas para imitar dicho ambiente como el ilustrado más a continuación.

25 Se apreciará que las condiciones del cultivo tridimensional son de modo que permiten la expansión de las células adherentes.

Tal como se usa en la presente memoria los términos “expandir” y “expansión” se refieren sustancialmente a menos mantenimiento de diferenciación de las células y finalmente el crecimiento celular, es decir, incremento de una población celular (por ejemplo, al menos 2 veces) sin diferenciación acompañante a dicho incremento.

30 Tal como se usa en la presente memoria los términos “mantener” y “mantenimiento” se refiere a sustancialmente menos renovación celular por diferenciación, es decir, población celular sustancialmente estacionaria sin diferenciación acompañante a dicho estacionamiento.

Tal como se ha mencionado, las células adherentes de este aspecto de la invención se recuperan de un tejido adiposo o placentario.

35 Las células placentarias se pueden obtener de una placenta a término o previo al término. La placenta preferiblemente se recoge una vez haya estado sin sangrar. La placenta preferiblemente se somete a perfusión durante un periodo de tiempo suficiente para separar las células residuales. El término “perfusar” o “perfusión” usado en la presente memoria se refiere al acto de echar o pasar un fluido sobre o a través de un órgano o tejido. El tejido placentario puede ser de cualquier mamífero; por ejemplo, el tejido placentario es humano. Una fuente conveniente de tejido placentario es de una placenta post parto (por ejemplo, 1-6 horas), sin embargo, la fuente de tejido placentario o células o el método de aislamiento del tejido placentario no es crítico para la invención.

40 Las células adherentes derivadas de placenta se pueden obtener de partes tanto fetales (es decir, amnion o partes internas de la placenta, véase **Ejemplo 1**) como maternas (es decir, decidua basal y decidua parietal) de la placenta. Los especímenes tisulares se lavan en un tampón fisiológico [por ejemplo, disolución salina tamponada de fosfato (PBS, del Inglés “Phosphate- Buffered Saline”) o tampón de Hank]. Se realizan suspensiones celulares sencillas mediante el tratamiento del tejido con una enzima digestiva (véase a continuación) o/y picando y tirando las partes de tejido a través de un filtro de nylon o mediante un pipeteado suave (Falcon, Becton, Dickinson, San José, CA) con medio de lavado.

45 Las células adherentes derivadas de tejido adiposo se pueden aislar mediante una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, dichos métodos están descritos en el documento de Patente U.S. N° 6.153.432. El tejido adiposo puede derivarse de sitios omentales/viscerales, mamarios, gonadales u otros de tejido adiposo. Una

fuerza de tejido adiposo es adiposo omental. En humanos, el adiposo generalmente se aísla por liposucción.

Las células adherentes aisladas de tejido adiposo se pueden derivar tratando el tejido con una enzima digestiva como colagenasa, tripsina y/o dispasa; y/o concentraciones efectivas de hialuronidasa o ADNasa; y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); a temperaturas entre 25-50°C, durante periodos de entre 10 minutos a 3 horas. A continuación, las células se pueden pasar a través de un filtro de nylon o malla de gasa de algodón ("Cheesecloth") de entre 20 micras a 1 mm. A continuación, las células se someten a centrifugación diferencial directamente en medios o sobre un gradiente de Ficoll o Percoll u otro gradiente particular. Se centrifugan las células a velocidades de entre 100 a 3.000xg durante periodos de entre 1 minuto y 1 hora a temperaturas de entre 4-50°C (véase el documento de patente U.S N° 7.078.230).

Además de las células adherentes derivadas de placenta o tejido adiposo, la invención también prevé el uso de células adherentes de otras fuentes celulares que se caracterizan por fenotipo de célula madre estromal (tal como se describirá más a continuación en la presente memoria). Las fuentes de tejido de las cuales se pueden recuperar las células adherente incluyen, pero no se limitan a, sangre de cordón, cuero cabelludo, folículos pilosos [por ejemplo, tal como se describe en la Solicitud de Patente U.S. 20060172304], testículos [por ejemplo, tal como se describe en Guan K., et al., Nature. 2006 27 de Abril; 440(7088):1199-203], mucosa olfativa humana [por ejemplo, tal como se describe en Marshall, CT., et al., *Histol Histopathol.* Junio de 2006; 21(6):633-43], saco vitelino embrionario [por ejemplo, tal como se describe en Geijsen N, Nature. 8 de Enero de 2004;427(6970):148-54] y fluido amniótico [Pieternella et al. (2004) *Stem Cells* 22:1338-1345], todos los cuales se sabe que incluyen células madre mesenquimales. Las células adherentes de estas fuentes de tejido se pueden aislar mediante el cultivo de células sobre una superficie adherente, aislando así las células adherentes de otras células en la población inicial.

Sin reparar en el origen (por ejemplo, placenta o tejido adiposo), preferiblemente se efectúa la recuperación celular bajo condiciones estériles. Una vez que se obtienen las células aisladas, se permite que se adhieran a un material adherente (por ejemplo, configurado como una superficie) para aislar de ese modo las células adherentes. El cultivo puede proceder bajo condiciones 2D tal como se describe en el **Ejemplo 4** de la sección Ejemplos y las células se pueden transferir más a condiciones 3D.

Tal como se usa en la presente memoria "un material adherente" se refiere a uno sintético, que se da de forma natural o una combinación del mismo de un material no citotóxico (es decir, biológicamente compatible) que tiene una estructura química (por ejemplo, grupos expuestos a superficie cargada) que puede retener las células sobre una superficie.

Los ejemplos de los materiales adherentes que se pueden usar de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen, pero no se limitan a, un poliéster, un polipropileno, un polialquileno, un polifluorocloroetileno, un cloruro de polivinilo, un poliestireno, una polisulfana, un acetato de celulosa, una fibra de vidrio, una partícula de cerámica, un matrigel, un componente de matriz extra celular (por ejemplo, fibronectina, condronectina, laminina), un colágeno, un ácido poli L láctico y una fibra de metal inerte.

Se pueden efectuar etapas adicionales de purificación o enriquecimiento para las células madre estromales usando métodos que son bien conocidos en la técnica (tal como mediante FACs que usa expresión de marcador de célula madre estromal, como se describe más a continuación en la presente memoria).

Ejemplos no limitantes de los medios base útiles en el cultivo de acuerdo con la invención incluyen Medio Mínimo Esencial Eagle, ADC-1, LPM (libre de Albúmina de Suero Bovina), F10(HAM), F12(HAM), DCCM1, DCCM2, RPMI 1640, Medio BGJ (con y sin Modificación Fitton-Jackson), Medio Basal Eagle (BME-con la adición de base de sal de Earle), Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM-sin suero), Yamane, IMEM-20, Medio Eagle de Modificación Glasgow (GMEM), Medio Leibovitz L-15, Medio 5A McCoy, Medio M199 (M199E-con base de sal de Earle), Medio M199 (M199H-con base de sal de Hank), Medio Mínimo Esencial Eagle (MEM-E-con base de sal de Earle), Medio Mínimo Esencial Eagle (MEM-NAA con aminoácidos no esenciales), entre numerosos otros, que incluyen el medio 199, CMRL 1415, CMRL 1969, CMRL 1066, NCTC 135, MB 75261, MAB 8713, DM 145, de Williams G., Neuman & Tytell, Higuchi, MCDB 301, MCDB 202, MCDB 501, MCDB 401, MCDB 411, MDBC 153. Un medio preferido para usarse en la invención es DMEM. Estos y otros medios útiles están disponibles en GIBCO, Grand Island, N.Y., USA y Biological Industries, Bet HaEmek, Israel, entre otras. Un número de estos medios se resumen en *Methods in Enzymology*, Volumen LVIII, "Cell Culture", pp. 62 72, editado por William B. Jakoby e Ira H. Pastan, publicado por Academic Press, Inc.

Los medios se pueden complementar por ejemplo con suero como el suero fetal de especies bovinas u otras, y opcionalmente o alternativamente, factores de crecimiento, vitaminas (por ejemplo, ácido ascórbico), citoquinas, sales (por ejemplo, B-glicerofosfato), esteroides (por ejemplo, dexametasona) y hormonas por ejemplo, hormona del crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, interleuquina 3, interleuquina 6, interleuquina 7, factor estimulador de colonia de macrófago, ligando c-kit/factor de célula madre, ligando de osteoprotegerina, insulina, factores de crecimiento similares a insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblasto, factor de crecimiento de

nervio, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaqueta y proteína morfogenética de hueso a concentraciones de entre niveles de picogramo/ml a miligramo/ml.

Además se reconoce que se pueden añadir componentes adicionales al medio de cultivo. Dichos componentes pueden ser antibióticos, antimicóticos, albúmina, aminoácidos y otros componentes conocidos en la técnica para el cultivo de células. Adicionalmente, se pueden añadir componentes para aumentar el proceso de diferenciación si se necesita (véase más a continuación).

Se apreciará que en el caso de las células adherentes de la invención se administran a un sujeto humano, las células y el medio de cultivo (por ejemplo, con los aditivos de medio descritos anteriormente) deberían ser básicamente tipo "xeno-free", es decir, carecer de cualquier contaminante animal, por ejemplo, micoplasma. Por ejemplo, se puede complementar el medio de cultivo con un reemplazamiento de suero, suero humano y/o sintético o factores producidos por recombinación.

Tal como se ha mencionado, una vez que las células están a mano se pueden pasar a ajustes bidimensionales o tridimensionales (véase **Ejemplos** 1 y 4 de la sección Ejemplos la cual viene a continuación). Aunque se apreciará, que las células se pueden transferir a una matriz configurada en 3D inmediatamente después del aislamiento o alternativamente, se puede pasar a ajustes tridimensionales después de las condiciones bidimensionales (tal como se a continuación menciona en la presente invención).

Por tanto, el material adherente de este aspecto de la invención se configura para el cultivo en 3D proporcionando de ese modo una matriz de crecimiento que aumenta sustancialmente la superficie de unión disponible para la adherencia de las células para imitar la infraestructura del tejido (por ejemplo, placenta).

Para producción a alta escala, el cultivo se puede efectuar en un biorreactor 3D.

Ejemplos de dichos biorreactores incluyen, pero no se limitan a, un biorreactor de flujo de pistón, un biorreactor de tanque agitado continuo, un biorreactor de lecho estacionario, un sistema biorreactor CelliGen Plus® (New Brunswick Scientific (NBS)) o un sistema de biorreactor BIOFLO 310 (New Brunswick Scientific (NBS)).

Tal como se muestra en el **Ejemplo** 4 de la sección Ejemplos, el biorreactor Celligen es capaz de la expansión en 3D de células adherentes bajo condiciones controladas (por ejemplo, niveles de temperatura y oxígeno) y con perfusión de medio de crecimiento celular constante. Además, se puede hacer un seguimiento de forma directa de los cultivos celulares para niveles de concentración de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio. El índice de consumo de glucosa y el índice de formación de lactato de las células adherentes permiten medir el índice de crecimiento celular y determinar el tiempo de recolección.

Otros biorreactores 3D que se pueden usar con la invención incluyen, pero no se limitan a, un biorreactor de tanque agitado continuo, donde un medio de cultivo es continuamente administrado dentro del biorreactor y continuamente se saca un producto, para mantenerse un estado regular constante de tiempo dentro del reactor, un biorreactor de tanque agitado con un cesto de lecho fibroso está disponible por ejemplo en New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, un biorreactor de lecho estacionario, un biorreactor de impulso por aire, donde generalmente se administra el aire dentro del fondo de un tubo de corriente central fluyendo hacia arriba mientras se forman burbujas, y soltando gas de escape a la parte superior de la columna, un biorreactor de perfusión de siembra celular con espumas poliactivas [tal como se describe en Wendt, D. et al., Biotechnol Bioeng 84: 205-214, (2003)] soportes porosos de ácido poli-L-láctico tubular (PLLA, del Ingles "Poly-L-lactid Acid") en un biorreactor de perfusión de flujo Radial [tal como se describe en Kitagawa et al., Biotechnology y Bioengineering 93(5):947-954 (2006)]. Otros biorreactores que se pueden usar de acuerdo con la invención están descritos en los documentos de Patente U.S. N°s 6.277.151, 6.197.575, 6.139.578, 6.132.463, 5.902.741 y 5.629.186.

La siembra celular preferiblemente se efectúa 100.000-1.500.000 células/mm en siembra. En una realización ilustrativa se sembraron un total de $150 \pm 30 \times 10^6$ células, se sembraron $3-5 \times 10^6$ célula/gr de vehículo o se sembraron $0,015-0,1 \times 10^6$ célula/ml.

Se pueden recoger las células cuando al menos aproximadamente el 10% de las células están en proliferación mientras evitan la diferenciación y el envejecimiento incontrolado.

El cultivo se efectúa durante al menos aproximadamente 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 10 días, 20 días, un mes o incluso más. Se apreciará que el cultivo en un biorreactor puede prolongarse este periodo. El cultivo de las células adherentes en el cultivo 3D se puede efectuar bajo un flujo continuo de un medio de cultivo. El paso también se puede efectuar para aumentar el número celular. Se apreciará que el medio de cultivo se puede cambiar para prolongar y mejorar las condiciones de cultivo.

Las células adherentes de algunas realizaciones de la presente invención comprenden al menos aproximadamente el 10%, 28%, 30%, 50%, 80% o más células proliferativas (como se puede analizar mediante FACS que hace un seguimiento de las fases S y G2/M).

5 Las células adherentes de algunas realizaciones de la invención pueden comprender al menos un “fenotipo de célula madre estromal”.

Tal como se usa en la presente memoria “un fenotipo de célula madre estromal” se refiere a un fenotipo estructural o funcional típico de una célula madre estromal (es decir, mesenquimal) derivada de médula ósea.

Tal como se usa en la presente memoria la frase “célula madre” se refiere a una célula que no se diferencia en fase terminal.

10 Así por ejemplo, las células pueden tener una forma de huso. Alternativamente o adicionalmente las células pueden expresar un marcador o una colección de marcadores (por ejemplo, marcador de superficie) típicos a células madre estromales. Los ejemplos de marcadores de superficie de célula madre estromal (positivos y negativos) incluyen pero no se limitan a CD105+, CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD3-, CD4-, CD34-, CD45-, CD80-, CD19-, CD5-, CD20-,
15 CD11B-, CD14-, CD19-, CD79-, HLA-DR- y FMC7-. Otros marcadores de célula madre estromales incluyen pero no se limitan a tirosin hidroxilasa, nestina y H-NF.

Las células adherentes de tejido de placenta generadas de acuerdo con las presentes enseñanzas tienen un perfil de expresión de gen esencialmente como se describen en el **Ejemplo 4** de la sección Ejemplos la cual viene a continuación.

20 Ejemplos de fenotipos funcionales típicos de células madre estromales incluyen, pero no se limitan a, actividad de supresión de célula T (no estimulan células T y en cambio suprimen la misma), la célula madre hematopoyética soporta actividad, así como cualquier diferenciación adipogénica, hepatogénica, osteogénica y neurogénica.

Cualquiera de estas características estructurales o funcionales se pueden usar para clasificar las células de la invención (véase los **Ejemplos 4** de la sección Ejemplos la cual viene a continuación).

25 Las poblaciones de células generadas de acuerdo con las presentes enseñanzas se caracterizan por un único perfil de expresión de proteína tal como se muestra en el **Ejemplo 1** de la sección Ejemplos. Así, por ejemplo, las células adherentes de placenta o tejido adiposo generadas de acuerdo con las presentes enseñanzas son capaces de expresar y/o secretar altos niveles de factores seleccionados. Por ejemplo, dichas células expresan o secretan SCF, Flt-3, familia de histona H2A (H2AF) o deshidrogenasa de aldehído X (ALDH X) al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o incluso 12 veces superior que los expresados o secretados por las células adherentes de placenta o tejido adiposo crecidas en un cultivo 2D. Adicionalmente o alternativamente, la población de células de la invención secreta o expresa IL-6, factor 2 de elongación de traducción eucariota (EETF2), reticulocalbina 3, dominio mano EF de unión a calcio (CN2) o calponina 1
30 músculo liso básico (CNN1) a un nivel al menos 2, 3 o 5 veces superior que el expresado o secretado por células adherentes de placenta o tejido adiposo crecido en un cultivo 2D. Adicionalmente o alternativamente, la población de las células de la invención se caracterizan por nivel inferior de expresión de otras diversas proteínas en comparación con las células de cultivo 2D. Así por ejemplo, secretar o expresar menos de 0,6, 0,5, 0,25 o 0,125 del nivel de expresión de ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1 (Hnrp1), precursor de isoforma 2 de antígeno de CD44, isoforma a de 3-
35 fosfoadenosin 5-fosfosulfato sintasa 2 (Paps2) o proteína ribosómica L7a (rpL7a) expresada o secretada por células adherentes de placenta o tejido adiposo crecidos en un cultivo 2D.

40 Tal como se muestra en los **Ejemplos 3-4** de la sección Ejemplos la cual viene a continuación, las células adherentes, y particularmente las células adherentes 3D, se encontraron que suprimen la reacción inmune de las células mononucleares de sangre de cordón humano en un ensayo de reacción de linfocito mezclado (MLR, del Inglés “Mixed Lymphocyte Reaction”), presentan por tanto actividades biológicas que se pueden usar preferentemente en la clínica (por ejemplo, actividad de supresión de célula T, actividad de soporte de célula madre hematopoyética).

45 De acuerdo con una realización de la invención, las células adherentes de la invención son capaces de suprimir la reacción inmune en un sujeto.

Tal como se usa en la presente memoria la frase “suprimir la reacción inmune en un sujeto” se refiere a disminuir o inhibir la reacción inmune que se da en un sujeto en respuesta a un antígeno (por ejemplo, una célula extraña o una porción de la misma). La respuesta inmune que puede ser suprimida por las células adherentes incluye respuestas inmunes humorales y respuestas inmune celulares, las cuales implican el reconocimiento específico de los antígenos patógenos vía anticuerpos y linfocitos T (proliferación de células T), respectivamente.
50

De acuerdo con una realización de la invención, las células adherentes de la invención se caracterizan por una actividad

inmunosupresora superior a la de las células adherentes de la placenta o el tejido adiposo crecidas en un cultivo bidimensional (2D).

De acuerdo con una realización de la invención, la actividad inmunosupresora comprende reducción en la proliferación de célula T.

5 Tal como se ha mencionado en la presente memoria anteriormente en el **Ejemplo 6** de la sección Ejemplos la cual viene a continuación, las células adherentes de la invención indujeron la angiogénesis *in vivo* (por ejemplo, flujo sanguíneo en la cadera y pierna), mejoró significativamente la función de miembro de animales sometidos a ligadura arterial, aumentó la densidad capilar y redujo el estrés oxidativo y la inflamación endotelial. Además, tal como se describe en detalle en el **Ejemplo 7** de la sección Ejemplos la cual viene a continuación, las células adherentes de la invención mejoraron significativamente la recuperación de la apoplejía en un modelo de rata.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al tratamiento de la isquemia en un sujeto en necesidad del mismo con una cantidad terapéuticamente eficaz de las células adherentes de la invención, tratando de ese modo la isquemia en el sujeto.

15 El término “isquemia” tal como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier patología (enfermedad, afección, síndrome o trastorno) caracterizada por o asociada con angiogénesis insuficiente. Los Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad periférica arterial (PAD) como la isquemia de miembro e isquemia de miembro crítica (CLI), enfermedad de corazón isquémico, enfermedad de cerebro isquémico (por ejemplo, apoplejía), curación retrasada de herida, curación retrasada de úlcera, trastornos asociados a la reproducción, arterioesclerosis, enfermedad vascular isquémica, enfermedad del corazón isquémica, isquemia miocárdica, enfermedad de la arteria coronaria (CAD, del Inglés “Coronary Artery Disease”), enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad de la arteria coronaria principal izquierda, enfermedad oclusiva arterial, isquemia periférica, enfermedad vascular periférica, enfermedad vascular del riñón, enfermedad arterial periférica, isquemia de miembro, isquemia de extremidad inferior, isquemia cerebral, enfermedad cerebro vascular, retinopatía, reparación retinal, trastorno de remodelado, síndrome de von Hippel-Lindau, enfermedad vascular telangiectasia isquémica hemorrágica hereditaria, enfermedad de Buerger, enfermedad renal isquémica y placenta isquémica.

20 Tal como se usa en la presente memoria el término “tratar” se refiere a inhibir o detener el desarrollo de una patología (por ejemplo, isquemia) y/o causar la reducción, remisión o regresión de una patología. Los expertos en la técnica entenderán que se pueden usar diversas metodologías y análisis para valorar el desarrollo de una patología, y similarmente, se pueden usar diversas metodologías y análisis para valorar la reducción, remisión o regresión de una patología. El término “tratar” también se puede referir a aliviar o disminuir un síntoma asociado con la patología.

30 Tal como se usa en la presente memoria la frase “sujeto en la necesidad del mismo” se refiere a cualquier sujeto (por ejemplo, mamífero), como un sujeto humano que es diagnosticado con o sufre de la patología.

Tal como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria y se describe en el **Ejemplo 8** de la sección Ejemplos la cual viene a continuación, los presentes inventores han encontrado que las células adherentes de la invención son capaces de la regeneración y/o reparación de tejido conectivo.

35 Por tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere al tratamiento de una afección médica que requiere la regeneración y/o reparación de tejido conectivo en un sujeto en necesidad del mismo mediante una cantidad terapéuticamente efectiva de las células adherentes de la invención.

40 La frase “tejido conectivo” se refiere a un tejido armazón (“framework”) de soporte que comprende filamentos de colágeno, fibras elásticas (por ejemplo, entre y alrededor de los vasos musculares y sanguíneos) y células simples. Ejemplos de tejidos conectivos incluyen, pero no se limitan a tejido conectivo denso (por ejemplo, ligamento, tendón, ligamento periodontal), tejido conectivo areolar (por ejemplo, con fibras proteínicas tales como colágeno y elastina), tejido conectivo reticular, tejido adiposo, sangre, hueso, cartílago, piel, disco intervertebral, pulpa dental, dentina, gingival, células que forman la matriz extracelular (ECM, del Inglés “Extracellular Matrix”), tejido conectivo laxo y células de músculo liso.

45 Tal como se usa en la presente memoria la frase “afección médica que requiere de regeneración y/o reparación de tejido conectivo” se refiere a cualquier patología caracterizada por daño de tejido conectivo (es decir, tejido que no funciona, tejido canceroso o precanceroso, tejido roto, tejido fracturado, tejido fibrótico o tejido isquémico) o pérdida (por ejemplo, después de un trauma, una enfermedad infecciosa, una enfermedad genética y similares). Ejemplos no limitantes de dichas patologías incluyen, fractura de hueso, cáncer de hueso (por ejemplo, osteosarcoma, metástasis de cáncer de hueso), herida de quemadura, defecto de cartílago articular y herida profunda.

La frase “administración al sujeto” se refiere a la introducción de las células de la invención al tejido objetivo. Las células

pueden estar derivadas del receptor o de un donante alogénico o xenogénico. Esta frase también abarca el "trasplante", "reemplazamiento celular" o "injerto" de las células de la invención dentro del sujeto.

5 El sujeto puede ser cualquier animal en necesidad de regeneración y/o reparación de tejido conectivo que incluye, por ejemplo, animales humanos o domesticados que incluyen, pero no se limitan a, caballos (es decir, equino), ganado, cabra, oveja, cerdo, perro, gato, camello, alpaca, llama y yak.

10 Las células adherentes de la presente invención se pueden usar para tratar afecciones que incluyen quistes de hueso subcondrales, fracturas de hueso, osteoporosis, osteoartritis, hueso degenerado, diversos cánceres asociados con pérdida de tejido conectivo (por ejemplo, cáncer de hueso, osteosarcoma, metástasis de hueso), daño de cartílago, defecto de cartílago articular, enfermedad de disco degenerativo, osteogénesis imperfecta (OI), vagos, heridas de quemadura, heridas profundas, curación retrasada de herida, ligamentos lesionados y tendones lesionados por ejemplo lesiones de tendones inducidas por sobrecarga en caballos y otros sujetos en necesidad del mismo (scomo se ha indicado anteriormente).

15 Las células que se pueden administrar de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen las células adherentes anteriormente descritas las cuales se pueden cultivar en ajustes tridimensionales o bidimensionales así como derivadas de las mismas parcialmente o terminalmente diferenciadas mesenquimales y no mesenquimales.

Los métodos de derivación de células específicas de linaje a partir de las células madre estromales de la invención son bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, los documentos de Patente U.S. N°s 5.486.359, 5.942.225, 5.736.396, 5.908.784 y 5.902.741.

20 Las células pueden ser nativas o genéticamente modificadas tal como para derivar a un linaje de interés (véase la Solicitud de Patente U.S. N° 20030219423).

Las células pueden ser de fuente autóloga o no autóloga (es decir, alogénica o xenogénica) de preparaciones frescas o congeladas (por ejemplo, criopreservadas).

Dependiendo de la afección médica, se puede administrar al sujeto fármacos químicos adicionales (por ejemplo, inmunomoduladores, quimioterapia, etc.) o células.

25 Puesto que las células no autólogas pueden inducir una reacción inmune cuando se administran al cuerpo se han desarrollado varios enfoques para reducir la posibilidad de rechazo de las células no autólogas. Estos incluyen o bien la supresión del sistema inmune del receptor o el encapsulamiento de las células no autólogas en el inmunoaislamiento, membranas semipermeables antes del trasplante.

30 Las técnicas de encapsulación generalmente se clasifican como microencapsulación, que implica vehículos esféricos pequeños y macroencapsulación, que implica lámina mayor de grasa y membranas de fibra hueca (Uludag, H. et al. Technology of mamalian cell encapsulation. Adv. Drug Deliv. Rev. 2000; 42:29-64).

35 Los métodos de preparación de microcápsulas son bien conocidos en las técnicas e incluyen por ejemplo aquellos descritos por Lu MZ, et al., Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine). Biotechnol Bioeng. 2000, 70:479-83, Chang TM y Prakash S. Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. Mol Biotechnol. 2001, 17:249-60, y Lu MZ, et al., A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine alpha-cyanocinnamylideneacetate). J. Microencapsul. 2000, 17:245-51.

40 Por ejemplo, las microcápsulas se preparan formando un complejo de colágeno modificado con una estructura de ter-polímero de 2-hidroxietil metilacrilato (HEMA, del Inglés "2-Hydroxyethyl Methylacrylate"), ácido metacrílico (MAA, del Inglés "Methacrylic Acid") y metil metacrilato (MMA, del Inglés "Methyl Methacrylate"), dando como resultado un espesor de cápsula de 2-5 µm. Dichas microcápsulas se pueden encapsular más con estructuras adicionales de ter-polímero de 2-5 µm para conferir una superficie suave cargada negativamente y para minimizar la absorción de proteína de plasma (Chia, S.M. et al. Multi-layered microcapsules for cell encapsulation Biomaterials. 2002 23: 849-56).

45 Otras microcápsulas están basadas en alginato, un polisacárido marino (Sambanis, A. Encapsulated islets in diabetes treatment. Diabetes Technol. Ther. 2003, 5:665-8) o sus derivados. Por ejemplo, se pueden preparar microcápsulas mediante la formación de complejo de polielectrolito entre el alginato de sodio de polianiones y el sulfato de celulosa de sodio con el hidrócloruro de poli(metilen-co-guanidina) de policación en presencia de cloruro de calcio.

50 Se apreciará que la encapsulación celular se mejora si se usan cápsulas más pequeñas. Por tanto, el control de calidad, la estabilidad mecánica, las propiedades de difusión y las actividades *in vitro* de las células encapsuladas mejoraron cuando se redujo el tamaño de cápsula desde 1 mm a 400 µm (Canaple L. et al., Improving cell encapsulation through size control. J. Biomater Sci. Polym. Ed. 2002; 13:783-96). Además, las biocápsulas nanoporosas con tamaño de poro

bien controlado tan pequeño como 7 nm, las químicas de superficie a medida y las microarquitecturas precisas se encontraron que inmuno aislaban con éxito microambientes para las células (Williams D. Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices, *Med. Device Technol.* 1999, 10:6-9; Desai, T.A. Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation. *Expert Opin Biol Ther.* 2002, 2:633-46).

5 Ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxiclolorquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE), etanercept, TNF.alfa, bloqueadores, un agente biológico que tiene como objetivo una citoquina inflamatoria, y Fármaco Antiinflamatorio No Esteroidal (NSAIDs, del Inglés "Non-Steroidal Anti-Inflammatory"), Ejemplos de NSAIDs incluyen, pero no se limitan a, ácido acetil salicílico, salicilato de magnesio de colina, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolac, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina, acetaminofeno, ibuprofeno, inhibidores de Cox-2 y tramadol.

10 En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, las células se pueden administrar o bien *per se* o preferiblemente como parte de una composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 Tal como se usa en la presente memoria una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de las células adherentes de la invención (es decir, células adherentes de un tejido seleccionado entre el grupo que consiste en placenta y tejido adiposo, el cual se obtiene de un cultivo tridimensional), con otros componentes químicos tales como vehículos farmacéuticamente adecuados y excipientes. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de las células a un sujeto.

20 De aquí en adelante, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que no causa irritación significativa a un sujeto y no abroga la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Ejemplos, sin limitaciones, de vehículos son propilenglicol, disolución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

25 En la presente memoria "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar más la administración de un compuesto. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

30 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el vehículo farmacéutico es una disolución acuosa de disolución salina.

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, la cual se incorpora en la presente memoria como referencia.

35 Uno puede administrar la composición farmacéutica de una manera sistémica (tal como se ha detallado anteriormente en la presente memoria). Alternativamente, uno puede administrar la composición farmacéutica localmente, por ejemplo, vía inyección de la composición farmacéutica directamente en una región tisular de un paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden producir por procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, realización de gragea, levigar, emulsificación, encapsulamiento, atrapamiento o liofilización.

40 Por tanto las composiciones farmacéuticas para usarse de acuerdo con la invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, los cuales facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en las preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada es dependiente de la ruta de administración elegida.

45 Para la inyección, se pueden formular los ingredientes activos de la composición farmacéutica en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer, tampón de sal fisiológico o medio de congelación que contiene crioprotectores. Para la administración transmucosa, se usan penetrantes apropiados para la barrera a penetrar en la formulación. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

50 Para cualquier preparación usada en la invención, se puede estimar inicialmente la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos *in vitro* y cultivo celular. Preferiblemente, se formula una dosis en un modelo animal para alcanzar una concentración deseada o título ("titer"). Dicha información se puede usar para determinar más exactamente

dosis útiles en humanos.

Se pueden determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente memoria mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales para la experimentación.

5 Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y los estudios animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para usarse en humano. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, la ruta de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico en vista de la afección del paciente, (véase por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p. 1). Por ejemplo, se puede hacer un seguimiento sintomáticamente en el paciente de Parkinson de las funciones motoras mejoradas que indican respuesta positiva al tratamiento.

10 Para la inyección, se pueden formular los ingredientes activos de la composición farmacéutica en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la disolución de Hank, disolución de Ringer, o tampón de sal fisiológico.

15 La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente a niveles del ingrediente activo los cuales son suficientes para regular eficazmente la síntesis del neurotransmisor mediante células implantadas. Las dosificaciones necesarias para alcanzar el efecto deseado dependerán de las características individuales y de la ruta de administración. Se pueden usar los ensayos de detección para determinar las concentraciones de plasma.

20 Dependiendo de la gravedad y de la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una única o una pluralidad de administraciones, con el curso del tratamiento que dura entre varios días y varias semanas o se alcanza la disminución del estado de la enfermedad.

25 La cantidad de una composición a administrar, por supuesto, será dependiente del individuo a tratar, la severidad de la afección, la manera de administración, la opinión del médico que prescribe, etc. La dosificación y el ritmo de administración serán sensibles a un seguimiento cuidadoso y continuo de la afección cambiante individual. Por ejemplo, se administrará a un paciente de Parkinson tratado con una cantidad de células que sea suficiente para aliviar los síntomas de la enfermedad, en base a las indicaciones del seguimiento.

30 Los modelos para la lesión de ligamento incluyen, pero no se limitan a, modelo de conejo de reconstrucción de ligamento cruzado anterior usando las células madre mesenquimales [Jit-Kheng et al., Arthroscopy (2004) 20(9):899-910], modelo de cabra para el uso de soportes bioresorbibles a largo plazo para reparar el ligamento cruzado anterior [Altman et al., J. Am Acad. Orthop. Surg. (2008) 16(4):177-187]. Los modelos para reparar tendón incluyen, pero no se limitan a, modelo de conejo Blanco de Nueva Zelanda adulto para la reparación de tendón mediada por célula madre mesenquimal autóloga [Awad et al., Tissue Eng. (1999) 5(3):267-77]. Los modelos para la reparación de hueso se describieron en, por ejemplo, Stem Cells in Endocrinology, Humana Press (2005) 183-206, que describe la manipulación de células madre mesenquimales para la reparación de hueso.

35 Después del trasplante, las células de la invención preferiblemente sobreviven en el área deseada durante un periodo de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 1 mes), de modo que se observa un efecto terapéutico

Las composiciones que incluyen la preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéuticamente compatible también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y marcarse para el tratamiento de una afección indicada.

40 Las composiciones de la invención pueden, si se desea, ser presentadas en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por FDA, el cual puede contener formas de una o más unidades de dosificación que contienen el ingrediente activo. El paquete puede, por ejemplo, comprender lámina de metal o plástico, tal como un paquete de ampollas. El paquete o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para la administración. El paquete o dispensador también puede estar provisto de una nota asociada con el recipiente en un forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la producción, el uso o venta de composiciones farmacéuticas, dicha nota es reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicha nota, por ejemplo, puede ser de etiquetación aprobada por la "U.S. Food and Drug Administration" para la prescripción de fármacos o de una inserción de producto aprobada.

50 Las células adherentes de la invención se pueden formular adecuadamente como composiciones farmacéuticas las cuales se pueden empaquetar adecuadamente como un artículo de producción. Dicho artículo de producción comprende un material de envasado que comprende una etiqueta para usarse en el aumento de la angiogénesis en un tejido, tratamiento de isquemia y/o tratamiento de una patología que requiere la regeneración y/o reparación de tejido conectivo, en el que el material de envasado envasa las células adherentes de la invención.

Se apreciará que las células adherentes de la presente invención son capaces de inducir inmunosupresión y/o tolerancia en un sujeto. Por tanto, las células adherentes se pueden usar para tratar cualquier afección en necesidad de inmunosupresión y/o tolerancia. Dichas afecciones incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias (incluyendo enfermedades inflamatorias agudas y crónicas) que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumatoides, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades de tejido conectivo y enfermedades sistémicas.

Ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis (Matsuura E. et al., *Lupus*. 1998; 7 Supl. 2:S135), infarto miocárdico (Vaarala O. *Lupus*. 1998; 7 Supl. 2:S132), trombosis (Tincani A. et al., *Lupus* 1998; 7 Supl. 2:S107-9), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Praprotik S. et al., *Wien Klin Wochenschr* 25 de Agosto de 2000; 112 (15-16):660), enfermedad autoinmune de anti factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al., *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(2):157), vasculitis de vasos pequeños necrotizados, poliangeitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, necrotización focal pauci-inmune y glomerulonefritis en forma de media luna (Noel LH. *Ann. Med. Interne* (Paris). Mayo de 2000; 151 (3):178), síndrome antifosfolípido (Flamholz R. et al., *J. Clin. Apheresis* 1999;14 (4):171), fallo del corazón inducido por anticuerpo (Wallukat G. et al., *Am. J. Cardiol.* 17 de Junio de 1999; 83 (12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann. Ital. Med Int.* Abril-Junio de 1999;14(2):114; Semple JW. et al., *Blood* 15 de Mayo de 1996;87 (10):4245), anemia hemolítica autoinmune (Efremov DG. et al., *Leuk Lymphoma* Enero de 1998;28 (3-4):285; Sallah S. et al., *Ann. Hematol.* Marzo de 1997;74(3):139), autoinmunidad cardíaca en enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. et al., *J. Clin. Invest* 15 de Octubre de 1996;98(8):1709) y autoinmunidad de linfocito T anti ayudante (Caporossi AP. et al., *Viral Immunol* 1998;11(1):9).

Ejemplos de enfermedades reumatoides autoinmune incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide (Krenn V. et al., *Histol Histopathol* Julio de 2000;15 (3):791; Tisch R., McDevitt HO. *Proc. Natl. Acad. Sci. Units S A* 18 de Enero de 1994;91 (2):437) y espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel et al., *Arthritis Res.* 2001;3(3):189).

Ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedad pancreática, diabetes de Tipo I, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopática, autoinmunidad de ovario, infertilidad por antiesperma autoinmune, prostatitis autoinmune y síndrome poliglandular autoinmune Tipo I. Las enfermedades incluyen, pero no se limitan, a enfermedades autoinmunes del páncreas, diabetes Tipo I (Castano L. y Eisenbarth GS. *Ann. Rev. Immunol.* 8:647; Zimmet P. *Diabetes Res. Clin. Pract.* Octubre de 1996; Supl. 34:S125) enfermedades del tiroides autoinmunes, enfermedad de Grave (Orgiazzi J. *Endocrinol Metab. North Am.* Junio de 2000;29 (2):339; Sakata S. et al., *Mol Cell Endocrinol* Marzo de 1993;92 (1):77), tiroiditis autoinmune espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S., *J. Immunol* 15 de Diciembre de 2000;165 (12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., *Nippon Rinsho* Agosto de 1999;57 (8):1810); mixedema idiopático (Mitsuma T. *Nippon Rinsho.* Agosto de 1999;57 (8):1759), autoinmunidad de ovario (Garza KM. et al., *J. Reprod. Immunol.* Febrero de 1998;37 (2):87), infertilidad por antiesperma autoinmune (Diekman AB. et al., *Am J. Reprod Immunol.* Marzo de 2000;43 (3):134), prostatitis autoinmune (Alexander RB. et al., *Urology* Diciembre de 1997;50 (6):893) y síndrome poliglandular autoinmune de Tipo I (Hara T. et al., *Blood.* Marzo de 1991;77 (5):1127).

Ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (García Herola A. et al., *Gastroenterol Hepatol.* Enero de 2000;23 (1):6), enfermedad celiaca (Landau YE y Shoenfeld Y. *Harefuah* 16 de Enero de 2000;138 (2):122), colitis, ileitis y enfermedad de Crohn.

Ejemplos de enfermedades inmunes cutáneas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de piel bullosa autoinmune, tales como, pero no se limitan a, pénfigo vulgar ("*pemphigus vulgaris*"), pénfigoide bulloso y pénfigo foliáceo.

Ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmune (Franco A et al., *Clin. Immunol Immunopathol* Marzo de 1990;54 (3):382), cirrosis biliar primaria (Jones DE. *Clin. Sci. (Colch)* Nov de 1996;91 (5):551; Strassburg CP. et al., *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* Junio de 1999;11 (6):595) y hepatitis autoinmune (Manns MP. *J. Hepatol* Agosto de 2000; 33 (2):326).

Ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple (Cross AH. et al., *J. Neuroimmunol* 1 de Enero de 2001;112 (1-2):1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. et al., *J. Neural Transm. Suppl.* 1997;49:77), miastenia grave (Infante AJ. y Kraig E., *Int. Rev. Immunol* 1999;18 (1-2):83; Oshima M. et al., *Eur J. Immunol* Diciembre de 1990;20 (12):2563), neuropatías, neuropatías motoras (Kornberg AJ. *J. Clin Neurosci.* Mayo de 2000;7 (3):191); síndrome de Guillain-Barre y neuropatías autoinmunes (Kusunoki S. *Am J. Med Sci.* Abril de 2000; 319 (4):234), miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. *Am J. Med Sci.* Abril de 2000;319 (4):204); enfermedades neurológicas paraneoplásticas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelar paraneoplástica y síndrome de stiff-man (Hiemstra HS. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. units S A* 27 de Marzo de 2001;98 (7):3988); síndrome de stiff-man no

5 paraneoplástico, atrofas cerebelares progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunes (Antoine JC. y Honnorat J. Rev. Neurol. (Paris) Enero de 2000; 156 (1):23); neuropatías disimmune (Nobile-Orazio E. et al., Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol Suppl. 1999;50:419); neuromiotonia adquirida, artrogriposis congénita múltiple (Vincent A. et al., Ann N.Y. Acad. Sci. 13 de Mayo de 1998; 841:842), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. et al., J. Neurol Neurosurg Psychiatry Mayo de 1994;57 (5):544) y enfermedades neurodegenerativas.

Ejemplos de enfermedades musculares autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, miositis, miositis autoinmune y síndrome de Sjogren primario (Feist E. et al., Int. Arch Allergy Immunol Septiembre de 2000; 123 (1):92) y enfermedad autoinmune de músculo liso (Zauli D. et al., Biomed. Pharmacother Junio de 1999;53 (5-6):234).

10 Ejemplos de enfermedades nefríticas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, nefritis y nefritis intersticial autoinmune (Kelly C.J. J. Am Soc. Nephrol. Agosto de 1990;1 (2):140).

Ejemplos de enfermedades autoinmunes relacionadas con la reproducción incluyen, pero no se limitan a, pérdida fetal repetida (Tincani A. et al., Lupus 1998; 7 Supl. 2:S107-9).

15 Ejemplos de enfermedades de tejido conectivo autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de oído, enfermedades de oído autoinmunes (Yoo T.J. et al., Cell Immunol Agosto de 1994;157 (1):249) y enfermedades autoinmunes del oído interno (Gloddek B. et al., Ann N.Y. Acad. Sci. 29 de Diciembre de 1997;830:266).

Ejemplos de enfermedades sistémicas autoinmunes incluye, pero no se limitan a, lupus sistémico eritematoso (Erikson J. et al., Immunol Res 1998;17 (1-2):49) y esclerosis sistémica (Renaudineau Y. et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. Marzo de 1999;6 (2):156); Chan OT. et al., Immunol Rev. Junio de 1999;169:107).

20 Además, las células adherentes se pueden usar para tratar enfermedades asociadas con trasplante de un injerto que incluye, pero no se limita a, rechazo del injerto, rechazo crónico del injerto, rechazo subagudo del injerto, rechazo hiperagudo del injerto, rechazo agudo del injerto e injerto frente a enfermedad del hospedante.

Tal como se usa en la presente memoria el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

25 Objetivos adicionales, ventajas y características novedosas de la invención llegaran a ser aparentes a un experto en la técnica en el examen de los siguientes **ejemplos**, los cuales no intentan ser limitantes. Adicionalmente, cada uno de las diversas realizaciones y aspectos de la invención como las delineadas anteriormente en la presente memoria y tal como se reivindica en la sección reivindicaciones de a continuación encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

30 La referencia se realiza ahora a los siguientes **ejemplos**, los cuales junto con las anteriores descripciones ilustran la invención de una manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican rigurosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al. (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Vols. I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como la descritas en los documentos de Patente N°s 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles están extensamente descritos en la patente y en la bibliografía científica, véase, por ejemplo, los documentos de Patente U.S. N°s 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262, 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S.J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D., and Higgins S.J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan como referencia como si se describieran completamente en la presente memoria. Otras referencias generales se proporcionan

en todo este documento. Los procedimientos en ellos se creen que son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector. Toda la información contenida allí dentro se incorpora en la presente memoria por referencia.

Ejemplo 1

5 Producción y cultivo de células adherentes de médula ósea, placenta y tejidos adiposos

Las células adherentes se cultivaron en un sistema biorreactor que contenía vehículos 3D para producir células adherentes en 3D, caracterizadas por un perfil de expresión de marcador de célula específica. Se ensayó la eficiencia de crecimiento a través del recuento celular. Se ensayó la capacidad de diferenciación de estas células mediante cultivo en un medio de diferenciación.

10 Materiales y Procedimientos Experimentales

Células adherentes de médula ósea-Se obtuvieron células adherentes de médula ósea (BM) de médula de esternones aspirados de donantes hematológicamente saludables sometiendo a cirugía a corazón abierto o biopsia de BM. Se diluyeron los aspirados de médula 3 veces en disolución de sales equilibradas de Hank (HBSS, del Inglés "Hank's Balanced Salts Solution"; GIBCO BRL/Invitrogen, Gaithersburg MD) y sometidos a centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Robbins Scientific Corp. Sunnyvale, CA). A continuación, las células mononucleares de médula ($<1,077 \text{ gm/cm}^3$) se recogieron, lavaron 3 veces en HBSS y se resuspendieron en medios de crecimiento [DMEM (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel) complementados con FCS al 10% (GIBCO BRL), mercaptoetanol 10^{-4} M (Merck, White House Station, NJ), Mezcla Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 $\mu\text{g/ml}$:1,25 un/ml; Beit Ha'Emek), L-glutamina 2 mM (Beit Ha'Emek)]. Se incubaron células de donantes individuales separadamente en matraces de cultivo de tejido (Coming, Acton, MA) a 37°C (CO_2 al 5%) con cambio semanalmente de los medios de cultivo. Las células se separaron cada 3-4 días usando tripsina-EDTA al 0,25% (Beit Ha'Emek). Después de 2-40 pases, cuando se alcanzó la confluencia al 60-80%, se recogieron las células para análisis o para cultivar en biorreactores.

Células adherentes derivadas de placenta-Se cortaron partes internas de una placenta completa a término del embarazo (Bnei Zion medical center, Haifa, Israel) bajo condiciones estériles, se lavaron 3 veces con Tampón de Hank y se incubaron durante 3 horas a 37°C con Colagenasa al 0,1% (1mg/ml de tejido; Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO). Usando pipeteado suave, a continuación, se lavaron las células en suspensión con DMEM complementado con FCS al 10%, mezcla Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 $\mu\text{g/ml}$:1,25 un/ml) y L-glutamina 2 mM, se sembraron en matraces de 75 cm^2 y se incubaron a 37°C en una incubadora de cultivo de tejido bajo condición humidificada con CO_2 al 5%. A continuación, se permitieron que las células se adhirieran a una superficie de plástico durante 72 horas después de lo cual se cambiaron los medios cada 3-4 días. Cuando se alcanzó confluencia del 60-80% (normalmente 10-12 días), se despegaron las células de los matraces de crecimiento usando tripsina-EDTA al 0,25% y se sembraron en nuevos matraces. A continuación, se recogieron las células cultivadas para el análisis o para cultivar en biorreactores.

Células adherentes derivadas de adiposo-Las células adherentes se obtuvieron de tejido adiposo humano de procedimientos de liposucción (Rambam Haifa, Israel). Se lavó el tejido adiposo exhaustivamente con volúmenes iguales de PBS y se digirieron a 37°C durante 30 minutos con colagenasa (20 mg/ml). A continuación, se lavaron las células con DMEM que contenía FCS al 10%, mezcla de Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 μg :1,25 $\mu\text{g/ml}$) y L-Glutamina y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT, del Inglés "Room Temperature"), se resuspendieron con disolución de lisis (1:10; Biological Industries, Beit Ha'Emek, Israel, para desechar glóbulos rojos) se centrifugaron y se resuspendieron con DMEM que contenían FCS al 10%, mezcla de Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 $\mu\text{g/ml}$:1,25 un/ml) y L-Glutamina. A continuación, se sembraron las células lavadas en un matraz de medio de cultivo estéril a $3-10 \times 10^7$ células/matraz. Al próximo día se lavaron las células con PBS para separar el RBC residual y las células muertas. Se mantuvieron las células a 37°C en una incubadora de cultivo de tejido bajo condición humidificada con CO_2 al 5%. El medio se cambió cada 3 a 4 días. A la confluencia del 60-80%, se separaron las células del matraz de crecimiento usando tripsina-EDTA al 0,25% y se sembraron en matraces nuevos. Después de 2-40 pases, cuando las células alcanzaron confluencia del 60-80%, se recogieron las células para análisis o para cultivar en biorreactores.

Biorreactor de Flujo de Pistón PluriX™ - El biorreactor de Flujo de Pistón PluriX™ (Pluristem, Haifa, Israel; como se ilustra en la Figura 1G, véase también el documento de Patente N° 6.911.201), se cargó con 1-100 ml vehículos porosos 3D empaquetados (4 mm en diámetro) realizados de una matriz de tejido no tejido ("non woven") de polyester. Estos vehículos son capaces de la propagación de gran número de células en un volumen relativamente pequeño. El instrumental de vidrio fue diseñado y fabricado por Pluristem (Pluristem, Haifa, Israel). El biorreactor se mantuvo en una incubadora de 37°C , con índice de flujo regulado y controlado por una válvula (6a en la Figura 1G), y bomba peristáltica (9 en la Figura 1G). El biorreactor contiene un punto de muestreo y de inyección (4 en la Figura 1G), permitiendo la siembra secuencial de células. El medio de cultivo se suministró a pH 6,7-7,4 desde un recipiente (1 en la Figura 1G). El

recipiente se suministró por una mezcla de gas filtrado (2, 3 en la Figura 1G), que contiene aire/CO₂/O₂ a diferentes proporciones, dependiendo de la densidad celular en el biorreactor. La proporción de O₂ se ajustó al nivel de O₂ disuelto en la salida del biorreactor, determinada por un monitor (6 en la Figura 1G). La mezcla de gas se suministró al recipiente por tubos de silicona o difusor (Degania Bet, Emek Hayarden, Israel). El medio de cultivo se pasó a través de un recipiente de separación (7 en la Figura 1G) que permite la recogida de células circulantes y no adherentes. La circulación del medio se obtuvo mediante una bomba peristáltica (9 en la Figura 1G). El biorreactor se equipó más con un punto de muestreo adicional (10 en la Figura 1G) y contenedores para intercambio continuo de medio.

Producción de células adherentes 3D-Los cultivos de célula 2D adherente humana primaria no confluyente, crecida tal como se ha descrito anteriormente, se trataron con tripsina, se lavaron, se resuspendieron en DMEM complementado con FBS al 10%, mezcla de Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 µg/ml:1,25 un/ml) y L-glutamina 2 mM y se sembraron (10³-10⁵ células/ml) por un punto de inyección sobre los vehículos 3D en un biorreactor de Flujo de Pistón estéril (véase la Figura 1G). Antes de la inoculación, el biorreactor se llenó con PBS-Ca-Mg (Biological Industries, Beit Ha'Emek, Israel), se sometieron a autoclave (120°C, 30 min) y se lavaron con medio de crecimiento de Dulbecco que contenía suero de ternero fetal inactivado por calor y una mezcla de Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 µg/ml:1,25 un/ml). El flujo se mantuvo a un índice de 0,1-5 ml/min. El proceso de siembra supuso el cese de la circulación durante 2-48 horas, permitiendo de ese modo que las células se fijaran sobre los vehículos. El biorreactor se mantuvo bajo temperatura controlada (37°C) y condiciones de pH (pH=6,7-7,4); usando una incubadora suministrada con aire estéril y CO₂ si es necesario. El medio de crecimiento se reemplazó 2-3 veces por semana. El medio de circulación se reemplazó con medios DMEM frescos, cada 4 horas a 7 días. A una densidad de 1x10⁶-1x10⁷ células/ml (después de 12-40 días de crecimiento), se separó el volumen total de medio del biorreactor y el biorreactor y los vehículos se lavaron 3-5 veces con PBS. A continuación, se despegaron las células adherentes 3D de los vehículos con Tripsina-EDTA; (Biological Industries, Beit Ha'Emek, Israel; 3-15 minutos con agitación suave, 1-5 veces) y a continuación se resuspendieron en DMEM y se crioconservaron.

Ensayos biológicos de calidad de célula adherente 3D-Las células adherentes 3D crioconservadas se descongelaron y se recontaron. Para la evaluación de la viabilidad celular, se sembraron 2x10⁵ células en un matraz de cultivo de tejido de 150 cm² y se evaluaron su capacidad de adherencia y repoblación en 7 días después de la siembra. A continuación, el fenotipo del marcador de membrana de célula adherente 3D se analizó usando citómetro de flujo de anticuerpos monoclonales de fluorescencia (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Comparación entre el perfil de marcador de membrana celular de células adherentes cultivadas en 3D y 2D usando ensayos de citometría de flujo-100.000-200.000 células adherentes de cultivos de sistema de flujo 3D y cultivos 2D se pusieron en suspensión en 0,1 ml de medio de cultivo en un tubo de 5 ml y se incubaron (4°C, 30 minutos, condiciones de oscuridad) con concentraciones de saturación de cada uno de los siguientes MABs: anti CD90 humano conjugado con FITC (Chemicon International Inc. Temecula, CA), anti CD73 humano conjugado con PE (Bactlab Diagnostic, Ceasarea, Israel), anti CD105 humano conjugado con PE (eBioscience, San Diego, CA), anti CD29 humano conjugado con FITC (eBioscience, San Diego, CA), anti CD45 humano conjugado con Cy7-PE (eBioscience), anti CD19 humano conjugado con PE (IQProducts, Groningen, Los Países Bajos), MAb anti CD14 humano conjugado con PE (IQProducts), anti CD11b humano conjugado con FITC (IQProducts) y anti CD34 humano conjugado con PE (IQProducts) o con MAb anti HLA-DR humano conjugado con FITC (IQProducts). Después de la incubación las células se lavaron dos veces en PBS enfriado en hielo que contenía FCS inactivado por calor al 1%, resuspendido en 500 µl de formaldehído al 0,5% y se analizaron usando la citometría de flujo FC-500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Comparación entre el perfil de proteína de células adherentes cultivadas en 3D y 2D usando análisis de espectrometría de masas-Se produjeron células adherentes de procedimientos de cultivo derivado 2D y 3D de la placenta tal como se ha descrito anteriormente. Brevemente, los cultivos 2D se produjeron mediante el cultivo de 0,3-0,75x10⁶ células en matraces de 175 cm² durante 4 días bajo atmósfera de CO₂ al 5% humidificada a 37°C, hasta alcanzar confluencia del 60-80%. Los cultivos 3D se produjeron mediante la siembra de 2-10x10⁶ células/gramo en un biorreactor que contenía 2.000 vehículos, y cultivando durante 18 días. Después de la recogida, se lavaron las células (x3) para separar todo el suero, se formó precipitado y se congeló. Las proteínas se aislaron de los precipitados usando Tri Reagent Kit (Sigma, Sant Louis, USA) y se digirieron con tripsina y se marcaron con reactivo iTRAQ (Applied Biosciences, Foster City, CA), de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Brevemente, los reactivos iTRAQ son reactivos de etiquetado isobárico, no poliméricos. Los péptidos dentro de cada muestra se marcan con una de las cuatro etiquetas codificadas por isótopo isobáricas vía sus cadenas laterales N-terminal y/o lisina. Las cuatro muestras marcadas se mezclaron y se analizaron los péptidos con espectrometría de masas. Después de la fragmentación del péptido, cada etiqueta libera un ión informador ("reporter") de masa distinto; por tanto, la relación de los cuatro informadores da abundancias relativas del péptido dado en una muestra. (información en: www.docs.appliedbiosystems.com/pebiidocs/00113379.pdf).

Los análisis proteómicos de cultivo 2D frente a cultivo 3D de células adherentes derivadas de placenta se realizaron en el centro proteómico Smoler (departamento de Biología, Technion, Haifa, Israel) usando LC-MS/MS sobre Premier de

QTOF (Waters, San Francisco, CA), con identificación y análisis hechos por el programa informático Pep-Miner [Beer, I. et al., Proteomics, 4, 950-60 (2004)] frente a la parte humana de la base de datos nr. Las proteínas analizadas fueron: ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1 (Hnrp1 GenBank Accession N° NP_005511), familia de histona H2A (H2AF, GenBank Accession N° NP_034566.1), factor de elongación de traducción eucariota 2 (EETF2, GenBank Accession N° NP_031933.1), reticulocalbina 3, dominio mano EF de unión a calcio (RCN2, GenBank Accession N° NP_065701), precursor de isoforma 2 de antígeno de CD44 (GenBank Accession N° NP_001001389), músculo liso básico calponina 1 (CNN1, GenBank Accession N° NP_001290), isoforma a de 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfato sintasa 2 (Paps2, GenBank Accession N°_004661), proteína ribosómica L7a (rpL7a, GenBank Accession N° NP_000963) y Aldehído deshidrogenasa X (ALDH X, GenBank Accession N° P47738). Cada experimento se hace dos veces. Debido a la naturaleza del análisis, cada proteína se analizó de acuerdo con el número de péptidos de los aparecidos en una muestra (2-20 apariciones de una proteína en cada análisis)

Comparación entre las proteínas secretadas en las células adherentes cultivadas 3D y 2D usando ELISA-Las células adherentes de procedimientos de cultivo derivadas 2D y 3D producidas de la placenta, se produjeron tal como se ha descrito anteriormente, con cultivos 3D durante la duración de 24 días. A continuación se recogieron los medios acondicionados y se analizaron para ligando Flt-3, IL6, Trombopoyetina (TPO) y factor de célula madre (SCF, del Inglés "Stem Cell Factor"), usando ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), en tres experimentos independientes. Los resultados se normalizaron para 1×10^6 células/ml.

El medio de diferenciación de osteoblasto- La diferenciación osteogénica se valoró cultivando células en un medio de diferenciación de osteoblasto que consistía en DMEM complementado con FCS al 10%, dexametasona 100 nm, 2-fosfato de ácido ascórbico 0,05 mM, B-glicerofosfato 10 mM, durante un periodo de 3 semanas. Se indicó la matriz calcificada mediante la tinción con Alizarin Red S y la fosfatasa alcalina se detectó por el kit de ensayo de fosfatasa alcalina (todos los reactivos de Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO).

Resultados Experimentales

El Sistema Biorreactor PluriX™ crea un microambiente similar al fisiológico.

Para hacer que resulten las condiciones de cultivo eficientes para las células adherentes, se creó artificialmente un ambiente similar al fisiológico (representado en la Figura 1A), usando el Biorreactor PluriX (Pluritem, Haifa, Israel; el vehículo se ilustra en la Figura 1G y se muestra antes de la siembra en la Figura 1B). Tal como se muestra en las Figuras 1C-F, células adherentes 3D producidas de médula ósea se cultivaron con éxito y se desarrollaron sobre la matriz 3D, 20 días (Figuras 1B-C, aumentado x150 y 250 respectivamente) y 40 días (Figuras 1C-D, aumentado x350 y 500 respectivamente) después de la siembra.

Las células crecidas en el sistema de Biorreactor PluriX se expandieron significativamente- Diferentes lotes de producción de células adherentes 3D derivadas de placenta se hicieron crecer en los sistemas de biorreactor PluriX. La densidad de siembra fue de 13.300 células/vehículo (a un total de 2×10^6 células). Catorce días después de la siembra, la densidad celular se multiplicó por 15 veces, alcanzando aproximadamente 200.000 células/vehículo (Figura 2), o 30×10^6 en un biorreactor de 150 vehículos. En un experimento diferente, las células se sembraron en el biorreactor a densidad de $1,5 \times 10^4$ células/ml y 30 días después de la siembra los vehículos contenían un número de célula superior por encima de 50 veces, es decir, aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/vehículo, o $0,5 \times 10^7$ células/ml. La densidad celular sobre los vehículos a diversos niveles de la columna de crecimiento era consistente, indicando una transferencia homogénea de oxígeno y nutrientes a las células. Así se probó que el sistema de cultivo en 3D proporciona condiciones de soporte para el crecimiento y el mantenimiento prolongado de cultivos de células mesenquimales de alta densidad, las cuales pueden crecer eficientemente hasta una cantidad suficiente con el propósito de soportar el injerto y el trasplante con éxito.

Las células adherentes 3D muestran características de marcador de membrana únicas- Para definir la diferencia en el perfil de secreción de moléculas solubles y producción de proteína, efectuado mediante el ambiente óseo que imita el procedimiento de cultivo en 3D, se efectuó el análisis FACs. Tal como se muestra en la Figura 3A, el análisis FACs de los marcadores celulares representan que las células adherentes 3D manifiestan un patrón de expresión de marcador diferente que las células adherentes crecidas en condiciones 2D. Las células cultivadas en 2D expresaron niveles significativamente superiores de marcadores de membrana positivos CD90, CD105, CD73 y marcadores de membrana CD29 en comparación con las células cultivadas en 3D. Por ejemplo, CD105 mostró un 56% de expresión en células cultivadas 3D frente al 87% en células cultivadas 2D. Las células adherentes de los cultivos de placenta tanto en 2D como 3D, no expresaron ningún marcador de membrana hematopoyético (Figura 3B).

Las células adherentes 3D muestran un perfil único de factores solubles- El nicho hematopoyético incluye células de soporte que producen una abundancia de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Para definir más la diferencia entre células adherentes cultivadas 2D y 3D, el perfil de las cuatro principales proteínas secretadas hematopoyéticas en los medios acondicionados de cultivos de célula adherente 2D y 3D se efectuó por ELISA. Las

Figuras 4A-C muestran que las células crecidas en condiciones 3D produjeron medios de condición con niveles superiores de ligando Flt-3 (Figura 4A), IL-6 (Figura 4B) y SCF (Figura 4C), mientras que niveles bajos de IL-6 y nivel cerca a cero de ligando Flt-3 y SCF se detectaron en los medios de condición de cultivos 2D. La producción de Trombopoyetina (TPO) fue muy baja e igual en ambos cultivos.

- 5 **Las células adherentes 3D muestran un perfil de proteína único en análisis de espectrometría de masas**-Para definir más la diferencia entre células adherentes cultivadas 2D y 3D, se analizó el perfil de proteína de estas células mediante espectrometría de masas. La Figura 4D muestra que las células adherentes cultivadas 2D y 3D muestran un perfil de expresión de proteína remarcadamente diferente. Tal como se muestra en la Tabla 1 de a continuación, las células cultivadas 3D muestran un nivel de expresión muy superior de H2AF y ALDH X (más de 9 y 12 veces superior, respectivamente) y un nivel superior de las proteínas EEEF2, RCN2 y CNN1 (ca. 3, 2,5 y 2 veces, respectivamente). Además, las células cultivadas en 3D muestran ca. la mitad de los niveles de expresión de las proteínas Hnrph1 y precursor de isoforma 2 de antígeno de CD44 y ca. un tercio de los niveles de expresión de Papss2 y rpL7a.

Tabla 1

proteína	Nivel de Proteína (relativo al grupo informador de iTRAQ)			
	Células adherentes cultivadas en 2D		Células adherentes cultivadas en 3D	
	Av (Promedio)	SD (Desviación estandar)	Av (Promedio)	SD (Desviación estandar)
Hnrph1	1,434493	0,260914	0,684687	0,197928
H2AF	0,203687	0,288058	1,999877	0,965915
EEEF2	0,253409	0,130064	0,799276	0,243066
RCN2	0,54	0,25	1,34	0,26
Precursor de isoforma 2 del antígeno de CD44	1,68	0,19	0,73	0,17
CNN1	0,77	0,15	1,55	0,17
Papss2	1,48352	0,314467	0,45627	0,137353
rpL7a	1,22	0,24	0,43	0,05
ALDH X	0,15847	0,22411	1,986711	0,212851

- 15 **Las células adherentes 3D tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos**-Para caracterizar más las células adherentes 3D, las células se cultivaron en un medio de diferenciación de osteoblasto durante un periodo de 3 meses. A continuación, se efectuó la precipitación de calcio. Se mostró que las células diferenciadas producen calcio (representado en rojo en las Figuras 5A-B) mientras que las células control mantuvieron un fenotipo similar a fibroblasto y demostraron no mineralización (Figuras 5C-D). Estos resultados muestran que las células adherentes 3D derivadas de placenta tiene la capacidad de diferenciarse *in vitro* a osteoblastos.

Ejemplo 2

Valoración de la capacidad de las células adherentes 3D derivadas de placenta para mejorar el injerto de HSC

- Se evaluó el soporte de las células adherentes 3D del injerto de HSC mediante el nivel de células hematopoyéticas humanas (hCD45+) detectadas en ratones NOD-SCID inmunodeficientes subletalmente irradiados o pretratados con quimioterapia.

Materiales y Procedimientos Experimentales

Aislamiento de células CD34+- Se tomaron muestras de sangre de cordón umbilical bajo condiciones estériles durante el parto (Bnei Zion Medical Center, Haifa, Israel) y las células mononucleares se separaron en fracciones usando centrifugación por gradiente de densidad Lymphoprep (Axis-Shield PoC As, Oslo, Norway) y se crioconservaron. Las células mononucleares descongeladas se lavaron y se incubaron con anticuerpos anti-CD34 y se aislaron usando midi MACS (Mittenyl Biotech, Bergish Gladbach, Alemania). Células de más de una muestra se juntaron para alcanzar la cantidad deseada (50.000-100.000 células).

Detección de células trasplantadas en ratones irradiados- Ratones NOD-SCID machos y hembras de siete semanas de edad (NOD-CB 17-Prkdcscid/J; Harlan/Weizmann Inst., Rehovot Israel) se mantuvieron en jaulas de sistema abierto estéril, se les dieron dietas estériles y agua ácida sometida a autoclave. Los ratones se irradiaron subletalmente (350 cGy), y a continuación (48 horas después de la irradiación) se trasplantaron con 50.000-100.000 células hCD34+, con o sin células adherentes adicionales ($0,5 \times 10^6$ - 1×10^6) derivadas de placenta o tejido adiposo (3-7 ratones en cada grupo), mediante inyección intravenosa a una vena lateral del rabo. Cuatro a seis semanas después del trasplante los ratones se sacrificaron por dislocación y se recogió la BM vaciando tanto fémures como tibias con tampón FACS (50 ml PBS, 5 ml FBS, 0,5 ml de ázida de sodio al 5%). Las células humanas en la BM de los ratones se detectaron mediante citometría de flujo y el porcentaje de las células que expresan marcador de células hematopoyéticas CD45 humanas y murinas en los ratones NOD-SCID tratados se efectuó mediante incubación de células con anti CD45-FITC humano (IQ Products, Groningen, Países Bajos). El umbral más bajo para el injerto humano inequívoco se designó al 0,5%.

Detección de células trasplantadas en ratones tratados con quimioterapia- Se inyectaron intraperitonealmente ratones NOD-SCID machos de 6,5 semanas de edad (NOD-CB17/JhkiHsd-scid; Harlan, Rehovot Israel), mantenidos tal como se ha descrito anteriormente para ratones irradiados, con Busulfan (25 mg/kg-durante 2 días consecutivos). Dos días después la segunda inyección con Busulfan, se inyectaron ratones sólo con células CD34+, o junto con $0,5 \times 10^6$ células adherentes, producidas de la placenta. 3,5 semanas después del trasplante, se sacrificaron los ratones, y se determinó la presencia de las células hematopoyéticas humanas tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria para ratones irradiados

Resultados Experimentales

Injerto de HSC mejorado de células adherentes 3D en ratones irradiados-Se trasplantaron conjuntamente células hematopoyéticas CD34+ humanas y células adherentes 3D derivadas de placenta o tejidos adiposos en ratones NOD-SCID irradiados. Se evaluó la eficiencia del injerto 4 semanas después del trasplante conjunto, y se compararon con ratones trasplantados con sólo HSC. Tal como se muestra en la Tabla 2, el trasplante conjunto de las células adherentes 3D y las células UCB CD34+ dieron como resultado índices de injerto considerablemente superiores y niveles superiores de células humanas en la BM de ratones receptores en comparación con ratones tratados con sólo células UCB CD34+.

Tabla 2

Células trasplantadas	h-CD45 promedio	STDEV
CD34	3,8	7,9
CD34+Células adherentes 3D de placenta	5,1	12,2
CD34+Células adherentes 3D de adiposo	8,7	9,6

Injerto de HSC mejorado de células adherentes 3D en ratones tratados con quimioterapia-Se trasplantaron conjuntamente células hematopoyéticas CD34+ humanas con 500.000 células adherentes 2D o células adherentes 3D derivadas de placenta, en ratones NOD-SCID pretratados con quimioterapia. Se evaluó la eficiencia del injerto 3,5 semanas después del trasplante conjunto, y en comparación con ratones trasplantados con sólo HSC. Tal como se muestra en la Tabla 3 y Figura 6, el trasplante conjunto de células adherentes y células CD34+ de UCB dio como resultado niveles de injerto superiores en la BM de los ratones receptores en comparación con sólo células UCB CD34+. Además, tal como se muestra en la Tabla 3, el nivel promedio del injerto era superior en ratones trasplantados conjuntamente con células adherentes derivadas de placenta crecidas en sistema de biorreactor PluriX (células adherentes 3D) que en los ratones trasplantados conjuntamente con células del mismo donante, crecidas en las condiciones de cultivo en 2D estático convencional (matraz).

Tabla 3

Células trasplantadas	h-CD45 promedio	STDEV
CD34	0,9	1,1
CD34+Cultivos 2D convencionales de placenta	3,5	0,2
CD34+Célula adherente 3D de placenta	6,0	7,9

5 Los resultados del análisis FACS mostrados en las Figuras 7A-B demuestran la ventaja de las células adherentes que se trasplantan conjuntamente con hHSCs (Figura 7B), y la capacidad de las células adherentes para mejorar la recuperación del sistema hematopoyético después del trasplante de HSC.

10 Tomados conjuntamente, estos resultados muestran que las células adherentes pueden servir como células soporte para mejorar la recuperación hematopoyética después del trasplante de HSCs (autólogas o alogénicas). La capacidad de las células adherentes 3D para aumentar el injerto de célula progenitor y/o madre hematopoyética después del trasplante de HSCs puede resultar de la capacidad de la célula adherente 3D de secretar citoquinas auxiliares de HSC que pueden mejorar la capacidad de recirculación ("homing"), autorenovación y proliferación de las células trasplantadas, o de la capacidad de aquellas células de reconstruir el microambiente hematopoyético dañado necesario para la recirculación y proliferación de las HSCs trasplantables.

Ejemplo 3

La supresión de la respuesta B de Linfocito y células adherentes cultivadas en 2D y 3D

15 Las células adherentes, y particularmente las células adherentes 3D, se encontraron que suprimen la reacción inmune de las células mononucleares de sangre de cordón humano en un ensayo MLR.

Materiales y Procedimientos Experimentales

20 **Ensayo de reacción de linfocito mezclado (MLR)**- Las propiedades inmunosupresoras e inmunoprivilegiadas de células adherentes de procedimientos de cultivo derivado 2D y 3D producidas de la placenta, se efectuaron mediante el ensayo MLR, el cual mide la histocompatibilidad en el locus HLA, ya que se efectúa por el índice de proliferación de los linfocitos incompatibles en cultivo mezclado de células sensibles (proliferación) y estimulantes (inproliferativas). Se usaron células mononucleares de sangre de cordón (CB) humano (2×10^5) como células sensibles y se estimularon al ser cultivadas conjuntamente con cantidades iguales (10^5) de Monocitos derivados de sangre periférica humana (PBMC) irradiados (3.000 Rad.), o con células adherentes cultivadas 2D o 3D, producidas de placenta, o una combinación de células adherentes y PBMCs. Cada ensayo se replicó tres veces. Las células se cultivaron conjuntamente durante 4 días en medio RPMI 1640 (que contenía FBS al 20% bajo atmósfera de CO₂ humidificada al 5% a 37°C), en una placa de 96 celdas. Las placas se sometieron a pulsos con $1 \mu\text{C}$ ³H-timidina durante las últimas 18 horas de cultivo. A continuación, se recogieron las células sobre filtro de fibra de vidrio y se cuantificó la absorción de timidina con un contador de destellos.

30 Resultados Experimentales

35 La Figura 8A muestra la respuesta inmune de células CB como la representada por la proliferación elevada de estas células cuando se estimulan con PBMCs, lo cual, sin estar obligado por la teoría, probablemente está asociado con proliferación de célula T en respuesta a la incompatibilidad a HLA. Sin embargo, se presentó un nivel considerablemente inferior de respuesta inmune por estas células cuando se incuban con las células adherentes de la invención. Además, la respuesta inmune de CB a PBMCs se redujo sustancialmente cuando se incubaba conjuntamente con estas células adherentes. Por tanto, de una manera similar a MSCs, se encontró que las células adherentes tienen la capacidad potencial de reducir la proliferación de célula T de las células donantes, típico de GvHD. Aunque ambos cultivos, 2D y 3D, redujeron la respuesta inmune de los linfocitos, y en línea con las otras ventajas de las células adherentes 3D descritas anteriormente en la presente memoria, las células adherentes 3D fueron más inmunosupresoras.

Ejemplo 4**Células adherentes 3D producidas por plurix en comparación con células adherentes 3D producidas por Celligen**

5 Para proporcionar células adherentes 3D a gran escala, se utilizó un nuevo sistema de producción referido en la presente memoria como Celligen.

Materiales y Métodos Experimentales

Biorreactor de Flujo de Pistón PluriX™- Tal como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente en la presente memoria.

Producción de células adherentes 3D por Plurix (células PLX)- Tal como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente en la presente memoria.

10 **Biorreactor Flujo de Pistón de Celligen™**- La producción de células adherentes por Celligen™ (Células PLX-C) está compuesta de diversas etapas muy importantes tal como se ilustra en la Figura 8B. El proceso comienza mediante la recolección de una placenta de un parto por cesárea planeada a término.

15 A continuación, se aíslan las células adherentes de todas las placentas, crecidas en matraces de cultivo de tejido (cultivos 2D), se recogieron y se almacenaron en nitrógeno líquido como reserva celular 2D (2DCS, del Inglés "2D-Cell Stock"), se descongeló la cantidad apropiada de 2DCS, se lavaron y se sembraron sobre vehículos en biorreactores para más expansión como cultivo 3D. Después de 1-3 semanas de crecimiento en los biorreactores, las células se recogieron y crioconservaron en fase gaseosa de nitrógeno líquido como PLX-C.

Recepción de Tejido Humano

20 Todas las placentas obtenidas se recibieron de la sala de maternidad bajo la aprobación del Comité de Helsinki del centro médico. Por lo tanto, todos los donantes de placenta firmaron un consentimiento informado y se realizó Chequeo del Donante y Ensayo del Donante (IPC1). Inmediatamente después de tomar la placenta del donante (durante el procedimiento de cesárea), se colocó en una bolsa de plástico estéril y a continuación en una caja Styrofoam con paquetes de hielo. La placenta se entregó e inmediatamente se colocó en un área de cuarentena hasta que se liberó para usarse por el Control de Calidad (QC) y el Aseguramiento de Calidad (QA). Todas las siguientes etapas de producción se realizaron en una cuarentena, instalación de habitación limpia hasta la aprobación de QC de los resultados del ensayo de micoplasma llegados y las células se liberan par el crecimiento celular en 2D.

Recuperación y Procesamiento de las células adherentes

30 Para iniciar el proceso, la placenta completa se cortó en piezas bajo condiciones asépticas bajo campana de flujo laminar, se lavaron con disolución tampón de Hank y se incubaron durante 3 horas a 37°C con Colagenasa al 0,1% (1 mg Colagenasa/ml tejido). El medio celular 2D (el medio 2D que comprende DMEM complementado con FBS al 10%, fungizona 0,25 µg/ml y gentamicina 50 µg/ml) se añadió y el tejido digerido se filtró bruscamente a través de un colador de metal estéril, se recogieron en un vaso de precipitado estéril y se centrifugaron (10 minutos, 1.200 rpm, 4°C). Usando pipeteado suave, a continuación, se lavaron las células en suspensión con Medio 2D complementado con antibióticos, se sembraron en matraces de 80 cm² y se incubaron a 37°C en una incubadora de cultivo de tejido bajo condición humidificada complementada con CO₂ al 5%. Después de 2-3 días, en los cuales se permitieron que las células se adherieran a la superficie del matraz, se lavaron con PBS y se añadió el Medio 2D.

Crecimiento Celular Bidimensional (2D)

40 Antes del primer pase, se juntaron las muestras del medio de crecimiento del 10% del número total de matraces en cuarentena y se tomaron para ensayar el micoplasma (IPC2). Si se encontraban que las células eran negativas para Micoplasma (EZ-PCR Mycoplasma kit, Biological Industries, Israel), las células se liberaban de la cuarentena. Después de 1-2 pases adicionales, se transfirieron las células a la habitación limpia de producción en 2D (2DP, del Inglés "2D Production"). Una vez en la Habitación 2DP, se continuó el cultivo durante otros 3-5 pases. La muestra IPC-3 se tomó para fenotipo inmune después del pase 4. A lo largo de todo el proceso, los cultivos crecieron en Medio 2D sin antibióticos en una incubadora de cultivo de tejido bajo condiciones humidificadas con CO₂ al 5% a 37°C. Después de un total de 6-8 pases (9-16 duplicaciones celulares), se recogieron las células y se crioconservaron como la Reserva Celular 2D (2DCS).

45 El primer pase normalmente se llevó a cabo después de 10-15 días. Comenzando en el pase 2 y continuando hasta el pase 6-8, las células se pasaron cuando el cultivo alcanzó la confluencia del 70-80%, normalmente después de 3-5 días (1,5-2 duplicaciones). Las células se despegaron de los matraces usando tripsina-EDTA al 0,25% (4 minutos a 37°C) y se sembraron en una densidad de cultivo de $3 \pm 0,2 \times 10^3$ células/cm². El tamaño de los matraces de cultivo de tejido

aumentaba según avanzaban los pases. El proceso de cultivo comenzó en matraz de cultivo de tejido de 80 cm², continuó en 175 cm², a continuación en 500 cm² (Matraz triple) y finalmente las células se sembraron en bandeja Cell Factory 10 (6320 cm²).

- 5 Antes de la crioconservación, al final del periodo de crecimiento de 2DCS, se recogió el medio de crecimiento y la muestra se preparó para enviarse a un laboratorio GLP aprobado para ensayo de Micoplasma (IPC 4).

Procedimiento de Crioconservación para el Producto de Reserva Celular 2D

Para la crioconservación de 2DCS, se recogieron las células cultivadas en 2D bajo condiciones asépticas usando tripsina-EDTA al 0,25%. Se centrifugaron las células (1.200 rpm, 10', 4°C), se recontaron y se resuspendieron en Medio 2D.

- 10 Para congelar, las suspensiones celulares se diluyeron 1:1 con Mezcla de Congelación 2D (las concentraciones finales fueron de DMSO al 10%, FBS al 40% y Medio 2D al 50%). Aproximadamente $1,5-2,5 \times 10^9$ células se produjeron a partir de una placenta. 4 ml de las células se almacenaron a una concentración final de 10×10^6 /ml en 5 ml de viales de polipropileno de crioconservación. Los viales se marcaron y se transfirieron a un congelador de índice controlado para un proceso de reducción de temperatura graduado (1°C/min), después de lo cual se transfirieron a almacenamiento en fase gas de un congelador de nitrógeno líquido localizado en la Habitación de Almacenamiento Frío. Este material se refirió como el lote de Reserva Celular 2D (2DCS).
- 15

Iniciación de los Procedimientos de Cultivo Tridimensional (3D)

- Para comenzar el cultivo 3D, una cantidad apropiada ($150 \pm 30 \times 10^6$) de células del 2DCS se descongelaron en la habitación 2DP y se lavaron con Medio 3D (DMEM con FBS al 10% y Hepes 20 Mm) para separar el DMSO antes de la siembra en los sistemas biorreactor en avance preparados. El contenido de cada vial 2DCS se pipeteó y se diluyó 1:9 con Medio 3D precalentado (37°C). Las células se centrifugaron (1.200 rpm, 10', 4°C) y se resuspendieron de nuevo en 50-100 ml de Medio 3D precalentado (37°C) en una botella estéril de 250 ml. Se tomó una muestra y se recontaron las células usando tinte Azul de Tripiano para determinar el número de células y la viabilidad. Se transfirió la suspensión celular bajo una campana de flujo laminar dentro de una botella de siembra de 0,5 L. Desde la botella de siembra la suspensión celular se transfirió vía tubería estéril al biorreactor por gravitación.
- 20
- 25

Producción de células adherentes 3D en la Descripción de Biorreactor del Biorreactor Celligen (PLX-C)

- La fase de crecimiento 3D se realizó usando un sistema de biorreactor CelliGen Plus® automático o BIOFLO 310 [(New Brunswick Scientific (NBS)] representado en la Figura 8C. El sistema biorreactor se usó para el cultivo de cultivo celular, en el cual las condiciones eran adecuadas para altas concentraciones celulares. El proceso de cultivo se llevó a cabo usando un biorreactor en un modo de perfusión. El biorreactor a escala de laboratorio se construyó de dos sistemas principales- el sistema control y el propio biorreactor (vaso y accesorios). Se hizo un seguimiento de los parámetros del proceso y se controlaron mediante una consola de control la cual incluía conectores para sondas, motor y bombas, lazo cerrado control para el Oxígeno Disuelto (DO), pH, perfusión y agitación (con un motor), un sistema control de gas, sistema de circulación y calentamiento de agua para el control de temperatura y un interfaz operador. Los parámetros controlados del proceso (tales como temperatura, pH, DO, etc.) se podrían manifestar en el interfaz operador y hacer un seguimiento mediante un controlador designado.
- 30
- 35

Procedimiento de crecimiento de cultivo celular en los biorreactores

- Tal como se indica en la sección anteriormente en la presente memoria, se descongelaron $150 \pm 30 \times 10^6$ células de la 2DCS crioconservada, se lavaron y se sembraron en un biorreactor estéril. El biorreactor contenía 30-50 gr de vehículos (discos Fibracel, NBS), hechos de Poliéster y Polipropileno y $1,5 \pm 0,1$ L de Medio 3D. El medio de crecimiento en el biorreactor se mantuvo en las siguientes condiciones: 37°C, Oxígeno Disuelto (DO) al 70% y pH 7,3. Los gases filtrados (Aire, CO₂, N₂ y O₂) se suministraron como se determina mediante por el sistema control para mantener el valor DO a 70% y el valor de pH a 7,3. Durante las primeras 24 horas, se agitó el medio a 50 Revoluciones por Minuto (rpm) y se aumentaron hasta 200 rpm el día 2. Durante los primeros 2-3 días, las células crecieron en un modo en lote. La perfusión se inició cuando la concentración de glucosa en el medio disminuyó por debajo de 550 mg/litro. El medio se bombeó desde el recipiente de alimentación al biorreactor usando tubería de silicona estéril. Todas las conexiones de la tubería se realizaron bajo flujo laminar usando conectores estériles. La perfusión se ajustó sobre una base diaria para mantener la concentración de glucosa constante a aproximadamente 550±50 mg/litro. Se tomó una muestra del medio de crecimiento cada 1-2 días para la determinación de la concentración de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio (analizador Bio-Profile 400, Nova Biomedical). El índice de consumo de glucosa y el índice de formación de lactato del cultivo celular permitió medir el índice de crecimiento celular. Estos parámetros se usaron para determinar el tiempo de recogida en base a los datos experimentales acumulados.
- 40
- 45
- 50

Recogida de las Células PLX-X Crecidas en 3D a partir del Biorreactor

El proceso de recogida celular comenzó al final de la fase de crecimiento (4-10 días). Se recogieron dos muestras del medio de crecimiento. Una muestra se preparó para ser enviada a un laboratorio GLP aprobado para ensayo de Micoplasma de acuerdo con los patrones de USP y EU, y el otro se transfirió a un congelador de índice controlado para un proceso de reducción de temperatura graduado (1°C/min), después del cual se transfirieron para almacenamiento en fase gaseosa de un congelador de nitrógeno líquido localizado en la Habitación de Almacenamiento Frío, en caso de que se necesitara un ensayo de Micoplasma repetido. Estas muestras del medio se consideraron como parte del ensayo de Micoplasma del producto final y los resultados se consideraron como parte de los criterios para sacar a la venta el producto.

El cultivo de crecimiento 3D se recogió en el área laminar Class-100 en la habitación 3DP tal como sigue:

Se vació el vaso de biorreactor usando gravitación vía tubería a un recipiente de desecho. El vaso se abrió, al separar la placa superior, y los vehículos se transfirieron de manera aséptica, usando fórceps estériles, desde la cesta a la red de la cesta superior (véase la Figura 8C). A continuación, el vaso del biorreactor se cerró y se rellenó con 1,5 L de PBS precalentado (37°C). La velocidad de agitación se aumentó a 150 rpm durante 2 minutos. El PBS se drenó vía tubería por presión o gravedad a la botella de desechos. El procedimiento de lavado se repitió dos veces.

Para liberar las células desde los vehículos, se añadió 1,5 L de Tripsina-EDTA precalentada a 37°C (0,25% de Tripsina, EDTA 1 mM) al vaso del biorreactor y se agitaron los vehículos durante 5 minutos en 150 rpm, 37°C. La suspensión celular se recogió en un recipiente estéril de 5 L que contenía 250 ml de FBS. La suspensión celular se dividió en 4 tubos de centrifuga estériles de 500 ml y se retiró una muestra de ensayo de Micoplasma. Los tubos de centrifuga cerrados se transfirieron a través del paso activo de 3DP dentro de la habitación de llenado de class 10.000 (FR1) en la cual las células se llenaron asépticamente y se crioconservaron como PLX-C.

Análisis del Ciclo Celular- Las células PLX-C obtenidas por Celligen y las células PLX obtenidas por Plurix se fijaron con EtOH O.N. al 70%, se centrifugaron y se resuspendieron en una disolución de yoduro de propidio (PI) que contenía 2 µg/ml de PI (Sigma), 0,2 mg/ml de ARNasa A (Sigma) y Tritón al 0,1% (v/v) (Sigma) durante 30 minutos. El ciclo celular se analizó mediante FACS.

“Array” de expresión de gen (Microarray)- Se obtuvieron células adherentes de placentas a término humanas y se expandieron por Plurix o por Celligen. Se obtuvieron tres diferentes lotes de células de cada uno de los métodos de expansión para examen adicional.

Se extrajo el ARN de las células (Qiagen-Rneasy micro kit) y se administró a un array de expresión de genoma completo Affymetrix. El chip usado GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, California, USA).

Análisis FACS de marcadores de membrana- Se tiñeron las células con anticuerpos monoclonales o como los previamente descritos. En resumen, se resuspendieron 400.000-600.000 células en 0,1 ml de tampón de citómetro de flujo en un tubo de ensayo de 5 ml y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT), en oscuridad, con cada uno de los siguientes anticuerpos monoclonales (MAbs): MAb de anti CD29 humano conjugado con FITC (eBioscience), MAb de anti CD73 humano conjugado con PE (Becton Dickinson), anti CD105 humano conjugado con PE (eBioscience), MAb de anti CD90 humano conjugado con PE (Becton Dickinson), MAb de anti CD45 humano conjugado con FITC (IQProducts), Mab de anti CD19 humano conjugado con PE (IQProducts), MAb anti CD14 humano conjugado con PE (IQProducts), Mab anti HLA-DR humano conjugado con FITC (IQProducts), MAb de anti CD34 humano conjugado con PE (IQProducts), MAb de anti CD31 humano conjugado con FITC (eBioscience), MAb anti KDR humano conjugado con FITC (R&B systems), MAb de marcador de fibroblastos antihumanos (D7-FIB) (ACRIS), MAb de anti CD80 humano conjugado con FITC (BD), MAb de anti CD86 humano conjugado con FITC (BD), MAb anti CD40 humano conjugado con FITC (BD), MAb anti HLA-ABC humano conjugado con FITC (BD), Isotipo IgG1 FITC conjugado (IQProducts), Isotipo IgG1 PE conjugado (IQProducts).

Las células se lavaron dos veces con tampón de citómetro de flujo, se resuspendieron en 500 µl de tampón de citómetro de flujo y se analizaron mediante citómetro de flujo usando Citómetro de Flujo FC-500 (Beckman Coulter). Se prepararon controles negativos con moléculas de fluorescencia de isotipo relevantes.

Reacción de Linfocito Mezclado (MLR)

Se estimularon 2×10^5 MNC (del donante A) derivadas de sangre periférica (PB) con cantidad igual de MNCs (del donante B) derivadas de PB irradiadas (3.000 Rad.). Se añadieron cantidades aumentadas de PLX-Cs a los cultivos. Se sembraron tres replicas de cada grupo en placas de 96 celdas. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 20%. Las placas se sometieron a pulsos con 1 µC de ^3H -timidina durante las últimas 18 horas del cultivo de 5 días. Las células se recogieron sobre un filtro de fibra de vidrio y la absorción de timidina se cuantificó con contador

de centelleo.

Para la tinción con CFSE, las células PB-MNC se tiñeron para CFSE (Molecular Probes) para la medida de proliferación antes del cultivo. Las células se recogieron después de 5 días y la intensidad de tinción con CFSE se detectó por Citometría de Flujo.

5 **ELISA**

Elisa se llevó a cabo tal como previamente se ha descrito. En resumen, las MNCs (aisladas de la sangre periférica) se estimularon con 5 µg/ml de ConA (Sigma), 0.5 µg/ml de LPS (Sigma), o 10 µg/ml (Sigma) en presencia de PLX-C bajo atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a análisis de citoquina usando kits de ELISA para IFN_γ (DIACLONE), TNF_α (DIACLONE) y IL-10 (DIACLONE).

10 **Resultados Experimentales**

Los cambios en la producción con Celligen en comparación con Plurix dieron como resultado diferencias muy importantes (resumidas en la Tabla 4, a continuación).

Tabla 4: Comparación entre el sistema Plurix y el sistema Celligen

Parámetro	Crecimiento celular de acuerdo con el Ejemplo 1	Enseñanzas de la presente invención	Mejoramiento
Volumen de trabajo (ml)	280	1500	Ampliación del proceso. Nivel de producción superior en las presentes enseñanzas (2-8 duplicación de la población)
Peso del vehículo (gr)	1,4	30	Ampliación del proceso
Configuración del lecho	Cónico, columna de 50 ml	Lecho Empaquetado en Cilindro	Presentes enseñanzas-Mejor flujo del medio y nutrientes. Enseñanzas del Ejemplo 1-Flujo ineficiente debido a la forma de salida estrecha de la estructura cónica. Mejor homogeneidad de la del flujo del medio. Canalización en las enseñanzas del Ejemplo 1.
Concentración celular en la siembra (célula/gr vehículo)	3x10 ⁵ célula/gr vehículo	5x10 ⁵ célula/gr vehículo	Mejor interacción célula a célula en las presentes enseñanzas
Concentración celular en la siembra (célula/gr vehículo)	0,015x10 ⁶ célula/gr vehículo	0,1x10 ⁶ célula/gr vehículo	Mejor interacción célula a célula en las presentes enseñanzas
Procedimiento de siembra	Siembra a volumen de medio bajo durante 24 h seguido de la adición de medio al volumen final de trabajo	Siembra en el volumen final de trabajo mientras se agita	Enseñanzas del Ejemplo 1- Distribución heterogenea del cultivo celular dentro del lecho de vehículo. Volumen de medio insuficiente en las primeras 24 horas del transcurso. Conduciendo a condiciones de trabajo indeseables (ambiente ácido)

Parámetro	Crecimiento celular de acuerdo con el Ejemplo 1	Enseñanzas de la presente invención	Mejoramiento
Duración de la fase de producción	14-21 días	4-10 días	Calidad mejor del producto. Proceso de recogida eficiente. Mejor rendimiento. Más bajo coste del proceso en las presentes enseñanzas.
Modo de operación	Lote repetido-cambio de medio dos veces a la semana.	Modo de perfusión-se ajustó el índice de acuerdo con la concentración de glucosa (el medio se cambio a concentración de glucosa de 550±50 mg/l)	Presentes enseñanzas-Cambios moderados de las condiciones respecto a la composición del medio por todo el trascurso. Eliminación continua de agentes tóxicos producidos por las células. En modo lote-concentración más baja de los nutrientes esenciales (factores limitantes). Menos residuos celulares.
Procedimiento de recogida	Recogida en tubos de 50 ml 3 ciclos de tripsinización	Recogida dentro del biorreactor Tripsinización 1 Ciclo	Presentes enseñanzas-El proceso de recogida más eficiente se llevó a cabo en un sistema cerrado. 1 ciclo de tripsinización-mejor calidad de las células
Agitación	Circulación del medio entre el recipiente de reserva a la columna usando bomba peristáltica	Impulsor del impulso celular	Presentes enseñanzas-El medio está fluyendo a través del lecho envasado-Mejor suministro de nutrientes y oxígeno al cultivo. Homogeneidad del medio Mejora otros lazos cerrados de control (temp. DO, pH)
Control de temperatura	La producción se llevó a cabo dentro de una incubadora. Control indirecto de la temperatura (de la cámara de la incubadora). Transferir calor vía interfaz de aire	Control directo on-line. Transferir calor vía cubierta de agua	Presentes enseñanzas-Medida más aguda de la temperatura del cultivo. Respuesta rápida. Tiempo corto para alcanzar el punto de ajuste ("set point")
Seguimiento de la temperatura	Manualmente. Seguimiento indirecto de la temperatura del agua	Seguimiento directo on-line	Presentes enseñanzas-Mejor seguimiento y control del proceso. Respuesta rápida al mal funcionamiento.
Seguimiento de DO	Ninguna	Seguimiento on-line	Presentes enseñanzas-Mejor seguimiento y control del proceso. Respuesta rápida al mal funcionamiento.

Parámetro	Crecimiento celular de acuerdo con el Ejemplo 1	Enseñanzas de la presente invención	Mejoramiento
Control de DO	Ninguno. Solamente introducción de aire	Control directo on-line de un set point específico usando Aire, O ₂ y N ₂ .	Presentes enseñanzas-Mejor control del nivel de DO. Mejor mantenimiento de unas condiciones específicas de trabajo.
Seguimiento y control de pH	Solamente seguimiento visual (rojo fenol como parte del medio)	Control y seguimiento on-line	Presentes enseñanzas-Mejor control del nivel de pH. Mejor mantenimiento de unas condiciones específicas de trabajo
Aireación	Solamente aspersion	Cubrir (aspersion como una opción)	Enseñanzas del Ejemplo 1- Aireación por aspersion crea espuma que podría dañar las células.

Los cambios en el proceso de producción dieron como resultado cambios en las características de las células adherentes 3D obtenidas. Estas diferencias se resumen a continuación.

Análisis del ciclo celular de PLX producidas por Plurix en comparación con PLX-C producidas por Celligen

- 5 Las células PLX-C obtenidas por Celligen se compararon con las células PLX obtenidas por Plurix para examinar la distribución de las células entre las diferentes fases del ciclo celular. Tal como se aclara a partir de las Figuras 9A-B, las células PLX-C expandidas por Celligen presentaban el típico perfil de proliferación (distribución de células entre las diferentes fases del ciclo celular). Específicamente, el 28% de las células estaban en las fases S y G2/M (Figura 9A).
10 Estos resultados indicaron que las células se recogieron durante la proliferación y que las condiciones del biorreactor Celligen mantuvieron el crecimiento celular.

- Comparación de microarray entre células obtenidas por Plurix y Celligen**-Los arrays (cariotipos moleculares) de la expresión del gen permitieron simultáneamente hacer un seguimiento de los perfiles de amplia expresión del genoma completo de las células adherentes derivadas de placenta humana desarrolladas por Plurix (PLX) o por Celligen (PLX-C). Estos resultados permitieron valorar la variación fenotípica subyacente del mecanismo molecular entre
15 células obtenidas por estos diferentes métodos de crecimiento (véase Tabla 5, a continuación).

Tabla 5: Expresión de Gen en células Celligen en comparación con Plurix

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopeptido	17,52	0,0401812
Familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A1	16,76	0,00145807
Arginina aminopeptidasa derivada de leucocito	13,99	0,88x10 ⁻⁶
pseudogen 27 de Queratina 27	12,25	0,000224998
Similar a Queratina, citoesqueletico 18 tipo I (Citoqueratina)	11,83	0,000304949
Receptor acoplado a proteína G, familia C, grupo 5, miembro A	10,35	3,39x10 ⁻⁵

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Integrina, alfa 6	9,84	0,0411667
Receptor 126 acoplado a proteína G	8,73	0,00197635
Factor coagulación III (tromboplastina, factor tisular)	7,36	0,012192
Inhibidor beta de disociación de Rho GDP (GDI)	7,36	0,00200066
Péptido señal, dominio CUB,3 similar a EGF	7,20	0,0255115
Proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopeptido	7,09	0,0139777
homólogo 1 dickkopf (<i>Xenopus laevis</i>)	7,06	3,06x10 ⁻⁷
Deshidrogenasa NAD(P)H, quinona I	6,63	0,000282423
Queratina 18	6,46	0,000514523
1 similar a receptor del factor de crecimiento de opioide	5,96	0,00114551
mal, similar a proteína de diferenciación de célula T	5,95	0,00664216
Neurofilamento, polipéptido de medio de 150 kDa	5,86	0,0190611
1 que contiene dominio DEP	5,82	0,000370513
Catepsina C	5,72	0,00532262
WAS	5,47	0,00178153
Inhibidor de serpin peptidasa, clado B (ovalbumina), miembro	5,44	0,0190218
Familia 7 de vehículo de soluto (transporte de aminoácido catiónico)	5,33	0,00688017
Proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopeptido	5,18	0,00357376
Componente complejo de cinetocoro NDC80, NUF2, homólogo (<i>S. cerevisiae</i>)	5,05	0,00276524
Proteína 1 de unión al dominio SH2 SCH	4,95	0,00430878
Tioredoxin reductasa 1	4,86	0,000197486
Proteína asociada a metástasis de cáncer de pulmón	4,85	0,00148024
Proteína 29 de activación de Rho GTPasa	4,85	0,0466211
Homólogo ciclo de división celular 20 (<i>S. cerevisiae</i>)	4,80	0,00514206
Familia con similitud de secuencia 111, miembro B	4,63	0,000125819
Quinasa de unión PDZ	4,54	0,00784983
Establecimiento de cohesión 1 homólogo 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	4,53	0,000773033
Proteína 4 de unión a guanilato	4,47	0,000215944
Lipasa A, ácido lisosomal, colesterol esterasa (enfermedad de Wolman)	4,42	0,0167385

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Miembro 20A de familia quinesina	4,39	0,00582352
KIAA0101	4,28	0,0105909
Inhibidor 3 de quinasa dependiente de ciclina(dual asociado a CDK2)	4,25	0,000732492
Timidilato sintetasa	4,23	0,00685584
Pauta de lectura 3 abierta del cromosoma 13	4,18	0,000548296
Aurora quinasa A	4,16	0,00632571
3 similar a nei endonucleasa VIII (E. coli)	4,14	0,00115606
Proteína centrosómica 55kDa	4,13	0,0021952
Receptor I de lipoproteína de baja densidad oxidizado (similar a lectina)	4,11	0,0205198
Homólogo denticleless (<i>Drosophila</i>)	4,05	0,00141153
Anilina, proteína de unión a actina	4,01	0,010923
Polipéptido de ribonucleótido reductasa M2	3,98	0,00834059
Dominio 1 de repetición de ankirina (músculo cardiaco)	3,93	0,00911953
Factor de transcripción 19 (SC1)	3,89	0,00109627
Queratina 18	3,89	0,000112551
Complejo de condensina I no-SMC, subunidad G	3,88	0,00537097
Ciclina E2	3,87	0,000203389
Tripsinogeno C	3,86	0,00416276
ARN nucleolar pequeño, C	3,81	0,0334484
Proteína de unión estrecha 2 (zona ocluyente 2)	3,81	0,00012562
Miembro 18A de familia de quinesina	3,78	0,00134108
Miembro 2C de familia de quinesia	3,77	0,0059888
1 similar a shugoshina (S. pombe)	3,76	0,00101318
Quinasa similar a polo 1 (<i>Drosophila</i>)	3,75	0,0140309
Timidin quinasa 1, soluble	3,73	0,00124134
Factor de transcripción 19 (SC1)	3,73	0,00124327
Homólogo de claspin (<i>Xenopus laevis</i>)	3,71	0,00683624
Subunidad del complejo GINS 1 (Homólogo Psfl)	3,69	0,00104515
glutation S-transferasa 1 microsómica	3,67	0,041701

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
1 similar a arilacetamida deacetilasa	3,67	0,000902645
SPC25, Componente de complejo de cinetocoro NDC80, homólogo (S. cerevisae)	3,65	0,00568662
Integrina, alfa 4(antígeno CD49D), subunidad alfa 4 de VLA-4)	3,62	0,0158411
Catenina (proteína asociada a cadherina), 1 similar alfa	3,57	7,46x10 ⁻⁵
Discos, homólogo grande 7 (<i>Drosophila</i>)	3,56	0,0317074
Similar a homólogo de oncogen viral de mieloblastosis v-myb (aviar)	3,55	0,0043878
Serglicina	3,54	0,0443487
Proteína N de centrómero	3,53	0,000540143
Ciclina A2	3,53	0,00965934
Proteína 8 de 22 kDa de choque por calor	3,52	0,0219583
Dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto	3,49	0,008548
Proteína 11A de activación de Rho GTPasa	3,49	0,00834174
Anemia de Fanconi, grupo de complementación I	3,43	0,00464532
BUB1 incipiente no inhibido por homólogo de benzimidazoles 1 (levadura)	3,42	0,0108258
Proteína ácida específica de ovario	3,42	0,00334641
Receptor colinérgico, muscarínico 2	3,41	0,0320078
Ciclo de división celular 2, G1 a S y G2 a M	3,41	0,0017111
Regulador de proteína de citoquinas 1	3,39	0,0325664
Componente 5 del complejo de mantenimiento de minicromosoma	3,38	0,00475504
Antígeno 5 asociado a esperma	3,37	0,00906321
Quinasa de cremallera de leucina embrionaria maternal	3,34	0,00908391
ARN nucleolar pequeño, C	3,33	0,0298703
Palmitoiltransferasa 1A de carnitina (hígado)	3,33	0,00170894
Similar a enzima de conjugación de ubiquitina E2S (Ubiqui	3,33	0,000415822
Miembro 1 de familia quinesina 1	3,33	0,00915145
Quinasa 7 relacionada con NIMA (nunca en mitosis gen a)	3,33	0,00159114
Metalopeptidasa ADAM con motivo de trombospondina tipo 1	3,32	0,0102751
Transformación, proteína 3 que contiene hélice superenrollada ("coiled-coil") ácido	3,31	0,0014577
Ciclina B1	3,29	0,0103092

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
1 similar a deficiente arresto mitótico MAD2	3,28	0,00488102
Dihidrofolato reductasa	3,28	0,00178879
3 que contiene dominio similar a NIPA	3,27	0,00164708
2 asociado a ciclo de división celular	3,26	0,0122226
Enzima que edita el ARNm de apolipoproteína B	3,26	0,00308692
Ciclina B2	3,25	0,016544
1 que contiene dominio de endonucleasa	3,24	0,000429245
Pseudogen de dihidrofolato reductasa	3,23	0,00141306
ATPasa, Na+	3,23	0,000381464
Factor de replicación C (activador 1)3, 38kDa	3,23	0,00109668
Dominio de repetición WD 76	3,22	0,0023531
Pleckstrin 2	3,17	0,0304429
Proteína I de activación de Rac GTPasa	3,17	0,00381613
Proteína 19 dedo PHD	3,17	0,000177604
Suprimido en leucemia linfocítica, 2	3,15	0,0109528
Proteína de centrómero I	3,15	0,0106816
Dominio 1 RING asociado a BRCA1	3,14	0,000540414
Regulador de señalización de G proteína 4	3,13	0,00781061
1 similar a proteína de unión STAM	3,11	0,0181743
Homólogo de sulfiredoxin 1 (S. cerevisiae)	3,10	5,14x10 ⁻⁵
Pauta de lectura 23 abierta del cromosoma 15	3,08	0,000147331
TTK protein quinasa	3,08	0,0112171
Complejo de condensina II de no SMC, subunidad G2	3,08	0,0130322
Villin 2 (ezrin)	3,07	0,0131934
Estomatina	3,06	0,00387095
Que contiene dominio A similar a protein tirosin fosfatasa	3,06	0,0419644
Inhibidor de serpin peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro	3,05	0,0030439
Miembro 4A de familia quinesina	3,05	0,0114203
Proteína hipotética DKFZp762E1312	3,05	0,00726778

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Enzima E2S de conjugación de ubiquitina	3,04	0,00118205
2 similar a deshidrogenasa de hidroxisteroide	3,03	3,71 x10 ⁻⁵
Familia ATPasa, 2 que contiene dominio AAA	3,01	0,00415258
TPX2, asociado a microtúbulo, homólogo (Xenopus laevis)	3,00	0,0253137
Agrupación ("Cluster") de histona 1, H4d	3,00	0,030183
Miembro 23 de familia quinesina	2,99	0,00790585
Proteína 2 de 70kDa de choque por calor	2,99	0,0215102
Complejo de reconocimiento de origen, similar a subunidad 1(levadura)	2,99	0,00207753
Dihidrolato reductasa	2,98	0,00307793
Receptor de motilidad mediado por hialuronano (RHAMM)	2,97	0,00467816
3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato Sintasa 2	2,97	1,43 x10 ⁻⁵
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 (mitocondrial)	2,95	0,00211969
Proteína 1 nucleolar y asociada a eje	2,95	0,00520875
Homólogo de diaphanous (Drosophila)	2,95	0,00107709
Miembro 14 de familia quinesina	2,94	0,00947901
Agrupación de histona 1, H1b	2,93	0,0470898
Proteína de unión a nucleótido de guanina (proteína G), inhibidor alfa	2,92	0,00184597
Componente 8 del complejo de mantenimiento de minicromosoma	2,92	0,000841489
Candidato 5 de susceptibilidad a cáncer	2,92	0,0330594
Leukotriene B4 12-hidroxidehidrogenasa	2,92	0,000685452
Cistein ligasa de glutamato, subunidad modificadora	2,91	0,00378868
Caja M1 "forkhead"	2,91	0,0203154
Proteína relacionada con diferenciación adiposa	2,90	0,000331751
1 que contiene el dominio de O-aciltransferasa unido a membrana	2,90	0,01185
Enzima E2T de conjugación a ubiquitina (putativa)	2,90	0,00741886
3 asociado a ciclo de división celular	2,89	0,006289
Integrina, alfa 3 (antígeno CD49C, subunidad alfa 3 de VLA-3)	2,88	0,00574148
Factor XIII de coagulación, polipéptido B	2,88	0,0294465
Homólogo RAD51 (homólogo RecA, E. coli)(S. cerevisiae)	2,87	0,000854739

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Casete de unión a ATP, subfamilia C (CFTR)	2,87	0,00382491
Familia con similitud de secuencia 29, miembro A	2,85	0,00111165
4A que contiene dominio SH2	2,84	0,0323646
Proteína de membrana, 1 palmitoilado, 55kDa	2,84	0,000396285
Subunidad reguladora 1B de protein quinasa de CDC28	2,84	0,0107391
Proteína de interacción con PSMC3	2,84	0,00766442
Interfacer 2 de microfibril de elastina	2,84	0,0192072
Topoisomerasa (ADN) II alfa 170 kDa	2,83	0,0321109
Proteína 106C de transmembrana	2,82	0,000214223
Agrupación de histona 1, H3b	2,80	0,0304598
Pauta de lectura abierta 24 del cromosoma 18	2,80	0,00347442
Sustrato 8 de vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico	2,79	0,0194949
Dominio 2 de unión nucleosómica al grupo de alta movilidad	2,78	0,0030536
SCL	2,78	0,00390288
Dominio hect y RLD4	2,78	0,00679184
Homólogo B de la función 1 de anti-silenciación de ASF1 (S. cerevisiae)	2,77	0,00543408
Interactor 13 del receptor de hormona de tiroide	2,76	0,0118319
8 asociado Ciclo de división celular	2,75	0,00619878
Miembro C1 de familia quinesina	2,74	0,00821937
Dominio 2 de unión nucleosómico del grupo de alta movilidad	2,73	0,00384071
Ornitina decarboxilasa 1	2,73	0,00144868
2 similar a homólogo de oncogen viral de mieloblastosis v-myb (aviar)	2,71	0,00989416
Ligando KIT	2,70	0,00641955
Ki regulado de la tirosin-(Y)-fosforilación de especificidad dual	2,70	0,0234606
Homólogo al transporte 80 intraflagelar (Chlamydomonas)	2,70	0,0247286
Proteína de transmembrana 48	2,69	0,00458248
Proteína 2 de unión EBNA1	2,69	0,00296292
Interactor ZW 10	2,69	1,88 x10 ⁻⁵
Exonucleasa 1	2,68	0,00739393

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Transcetolase (síndrome de Wernicke-Korsakoff)	2,68	1,92 x10 ⁻⁵
Receptor 1 de somatostatina	2,68	0,0144901
Deshidrogenasa 3 de isocitrato (NAD+) alfa	2,67	0,00297129
Proteína 2 asociada a citoesqueleto	2,67	0,0030499
Componente 4 del complejo de mantenimiento de minicromosoma	2,67	0,00342054
Inhibidor de la unión 1 a ADN, hélice-bucle-hélice negativo dominante	2,66	0,036485
Subunidad 1B reguladora de protein quinasa CDC28	2,66	0,0145263
Queratina 18	2,66	8,40 x10 ⁻⁵
Molécula CD97	2,66	0,00994045
Pauta de lectura 173 abierta del cromosoma 6	2,64	0,00222408
3 que contiene Dominio de BTB (POZ)	2,62	0,0166824
Sordera, dominante autosómico 5	2,62	0,00235481
Proteína KIAA0286	2,62	0,00130563
Anemia Fanconi, grupo de complementación D2	2,61	0,0281405
Quinasa 4 similar a polo (Drosophila)	2,60	0,00209633
Polipéptido de reductasa M1 de ribonucleótido	2,60	0,000170076
Enzima 1 málica, dependiente de NADP(+), citosólico	2,59	0,0435444
Complejo de condensina I de no-SMC, subunidad H	2,59	0,0216752
Proteína A3 de unión a calcio S 100	2,58	0,0324073
Enzima E2L3 de conjugación a ubiquitina	2,57	0,00343347
BUB1 incipiente no inhibido por homólogo beta de benzimidazoles 1	2,56	0,0166047
Glicerol quinasa	2,55	2,66E x10 ⁻⁵
ARN Polimerasa II de TAF9B, proteína de unión a la cajaTATA (TBP)-as	2,54	0,0170365
ARN Polimerasa II de TAF9B, proteína de unión a la caja TATA (TBP)-as	2,54	0,0170365
Agrupación de histona 1, H2bg	2,52	0,000180822
Caja 2 del grupo de alta movilidad	2,5 2	0,0196872
Quinasa 2 relacionada con NIMA (nunca en mitosis gen a)	2,50	0,00289469
Rico en prolina 11	2,50	0,0357125
Myopalladin	2,49	0,0255088

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
1 que contiene dominio brix	2,49	0,00471977
5 asociado ciclo de división celular	2,49	0,01021
Fucosidasa, alfa-L-2, plasma	2,49	0,00540929
Quinasa 2 dependiente de ciclina	2,49	0,00250724
Receptor de lamina B	2,49	0,000151784
Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (Síndrome de Lesch-Nyhan)	2,49	0,000634057
25 que contiene motivo tripartito	2,47	0,0456344
Proteasoma (prosome, macropain) subunidad, tipo beta, 9 (lar)	2,46	0,202595
Proteasoma (prosome, macropain) subunidad, tipo beta, 9 (lar)	2,46	0,202595
Proteasoma (prosome, macropain) subunidad, tipo beta, 9 (lar)	2,46	0,202595
Esfingomielina sintasa 2	2,46	0,0020701
Proteína 62 de membrana	2,45	0,00761064
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	2,44	0,00278311
Proteína I de finger PHD	2,44	0,010191
1 similar a retinoblastoma (p107)	2,44	0,00319946
KIAA1524	2,43	0,0380688
ST6 (alfa-N-acetil-neuraminil-2,3-beta-galactosil-1,	2,43	0,00830766
Cofilin 2 (músculo)	2,43	0,0459235
Proteína LOC201725 hipotética	2,42	0,000313319
Homólogo A del ciclo de división celular 25 (<i>S. pombe</i>)	2,42	0,000341692
Cáncer de pecho 1, comienzo temprano	2,41	0,0180553
Transaldolasa 1	2,41	0,00199537
Homólogo 4 de renovación de ARNm (<i>S. cerevisiae</i>)	2,41	0,00373104
Glucosaminil (N-acetil) transferasa 1, núcleo 2 (beta-1,6-N-	2,41	0,0197148
Regulador 1 de BMP transmembrana rico en cisteína (similar a cordina)	2,41	0,0267286
Inhibidor de la vía del factor de tejido (asociado a lipoproteína)	2,40	0,0356227
Pauta de lectura 59 abierta del cromosoma 16	2,40	0,00185191
Glicogenina 1	2,39	0,0224317
Proteína 154 de membrana	2,39	0,0045589

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
1 similar antígeno de nefritis tubulointersticial	2,39	0,00510812
CTP Sintasa	2,38	8,80 x10 ⁻⁵
Fenilalanil ARNt sintetasa, subunidad beta	2,38	0,000245973
Geminina, inhibidor de replicación de ADN	2,38	0,00167629
Lamin B 1	2,37	0,0477748
SPC24, componente del complejo de cinetocoro NDC80, homólogo (<i>S. cerevisiae</i>)	2,36	0,00287227
Glutaciona reductasa	2,36	0,00353875
1 similar a proteína ribosómica L22	2,36	0,00335381
Fumarilacetoacetato hidrolasa (fumarilacetoacetasa)	2,36	3,88 x10 ⁻⁵
ARN nucleolar pequeño, C	2,35	0,0188991
Familia con similitud de secuencia 64, miembro A	2,35	0,0019785
Oncogen de secuencia 2 de transformación de célula epitelial	2,35	0,000571152
Polimerasa (ADN dirigido), épsilon 2 (subunidad de p59)	2,34	0,00479612
Glicerol quinasa	2,34	3,37 x10 ⁻⁶
Glutaciona S-transferasa M2 (músculo)	2,33	0,0402076
Factor de elongación, ARN polimerasa II, 2	2,33	0,0130017
Thioredoxin	2,33	0,009636
Polimerasa (ADN dirigido), alfa 2 (subunidad de 70 kD)	2,32	00033903
Cáncer de pecho 2, comienzo temprano	2,32	0,00586847
Similar al ciclo de división celular 45 CDC45 (<i>S. cerevisiae</i>)	2,32	0,00735977
Familia de histona H2A, miembro Z	2,32	0,0129697
Transportador 1, casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR)	2,31	0,0164234
Transportador 1, casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR)	2,31	0,0164234
Transportador 1, casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR)	2,31	0,0164234
Homólogo de 3 asociado al complejo nucleolar (<i>S. cerevisiae</i>)	2,30	0,000373346
ATPasa, transportador de Ca ⁺⁺ , membrana de plasma 4	2,30	0,023011
Componente 7 del complejo de mantenimiento de minicromosoma	2,30	0,0457691
Proteína de interacción con TIMELESS	2,29	0,00771062
Proteína 1 de unión von Hippel-Lindau	2,28	0,00329061

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
sustrato 2 de toxina botulina C3 relacionado con Ras (familia rho, sma	2,28	0,0292466
Timopoyetina	2,28	0,0223176
Peptidilpropil isomerasa F (ciclofilina F)	2,28	0,00093846
Molécula de adhesión celular de leucocito activado	2,27	0,00242163
dedo RING 5 del grupo polycomb	2,27	0,000294142
Proteína 1 de activación de Ran GTPasa	2,27	9,68 x10 ⁻⁵
Factor de replicación C (activador 1) de 4,37 kDa	2,26	0,00164152
Tubulina, beta 2C	2,26	0,000346744
Componente 10 del complejo de mantenimiento de minicromosoma	2,26	0,0037925
Familia histona H2B, miembro S	2,25	0,000885505
Gamma-glutamil hidrolasa (conjugasa, folilpoligammaglutamil)	2,25	0,0195219
Factor de finalización de transcripción, ARN polimerasa II	2,25	0,000393489
Polimerasa (ADN dirigido), delta 2, subunidad reguladora 50k	2,25	0,0123823
Transportador 1, casete de unión a ATP, sub familia B (MDR)	2,25	0,00859077
Transportador 1, casete de unión a ATP, sub familia B (MDR)	2,25	0,00859077
Transportador 1, casete de unión a ATP, sub familia B (MDR)	2,25	0,00859077
Agrupación de histona 1, H2bf	2,25	0,0124279
Factor 1A de inicio de traducción eucariota, ligado a X	2,24	0,00330183
Fosfoglucomutasa 2	2,24	0,00818204
D3 D2-enoil-CoA isomerasa peroximal	2,24	0,00148722
Proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido	2,24	0,0177928
1 expresado Fase G-2 y S	2,23	0,0241887
Componente 2 del complejo de mantenimiento de minicromosoma	2,23	0,0021347
Familia con similitud de secuencia 72, miembro A	2,23	0,00143248
RMI1, inestabilidad 1 del genoma mediada por RecQ, homólogo (S. cerevisae)	2,23	0,00294705
Proteína FLJ20105	2,23	0,0127979
Deficiencia 2 del factor de coagulación múltiple	2,22	0,0116892
Fitoceramidasa, alcalina	2,22	0,0157729
68 que contiene dominio de hélice superenrollada	2,22	0,00227586

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Dedicador de citoquinesis 11	2,21	0,00697577
Polipéptido del factor alfa de crecimiento derivado de plaquetas	2,21	0,00176418
N-acilesfingosina amidohidrolasa (no-lisosómica cerami	2,20	0,00728536
Proteína 2 asociada a quinasa de fase S (p45)	2,20	0,00230153
Polipéptido G(32kD) de la polimerasa (ARN) III (ADN dirigido)	2,20	0,0298794
Proteína 1 de interacción con 6 similar al factor de ribosilación ADP	2,20	0,00139745
Agrupación de histona 1, H2bh	2,19	0,0377748
Complejo de reconocimiento de origen, similar a subunidad 5 (levadura)	2,19	0,049697
Subunidad 2 reguladora de protein quinasa CDC28	2,19	0,0128024
Agrupación de histona 1, H4c	2,19	0,0112695
Proteína hipotética LOC729012	2,19	0,000446087
Polipéptido 39 de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)	2,19	0,000340561
Factor 1 de ensamblaje de cromatina, subunidad B (p60)	2,18	0,0119687
Proteína que interactúa con MLF1	2,18	0,0177203
Serina asociada a microtúbulo	2,18	0,00536974
Secuencia B relacionada con polipéptido MHC clase I	2,18	0,0165406
2 similar a shugoshin (<i>S. pombe</i>)	2,18	0,000852557
Subunidad 6 de homólogo fotomorfogénico constitutivo COP9 (Arab	2,18	0,000793512
Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (NADP+ dependiente)	2,18	0,00119726
Pauta de lectura 167 abierta de cromosoma 6	2,18	0,0011095
1 de transformación de tumor pituitario	2,17	0,0485166
Ribonucleasa H2, subunidad A	2,17	0,00669936
Reparación defectuosa que complementa la reparación por rayos X en jamón chino	2,16	0,0369865
Proteína de membrana, 5 palmitoilatado (membrana subfamilia MAGUK p55)	2,16	0,00211873
Carioferina alfa 2 (RAG cohort 1, importina alfa 1)	2,16	0,000650645
Que contiene dominio de homología pleckstrin, familia A (fosfoi	2,15	0,0256434
Similar a proteína L39 ribosómica	2,15	0,00429384
Carioferina alfa 2 (RAG cohort 1, importina alfa 1)	2,15	0,000700649
Unión proteína al precursor beta amiloide (A4), familia B, m	2,15	0,00201004

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Componente 3 del complejo de mantenimiento minicromosoma	2,14	0,0018389
Agrupación de histona 1, H2ai	2,14	0,0129155
Pauta de lectura 34 abierta de cromosoma 13	2,14	0,000702936
Homólogo de RAD18 (<i>S. cerevisiae</i>)	2,14	0,0016685
Repetición WD y proteína 1 de unión a ADN caja HMG	2,13	0,0034833
Similar a sulfuro quinona reductasa (levadura)	2,13	0,0473641
Pauta de lectura 63 abierta del cromosoma 16	2,12	0,000804179
Fosfoproteína 1 de la fase M	2,12	0,0271814
Componente 6 del complejo de mantenimiento de minicromosoma	2,12	0,0161279
Homeobox A9	2,11	0,00520942
Factor de crecimiento de fibroblasto 9 (factor de activación glial)	2,10	0,0475844
Homólogo C del ciclo de división celular 25 (<i>S. pombe</i>)	2,10	0,0169914
Pauta de lectura 64 abierta del cromosoma 9	2,10	0,0265979
Quinasa 1 del motivo de homología U2AF (UHM)	2,09	0,0255167
Factor C de replicación (activador 1)2, 40kDa	2,09	0,00768959
Proteína LOC440894 hipotética	2,09	0,0103358
Polipéptido de 16kDa de ribonucleoproteína D1 nuclear pequeña	2,09	0,0334665
Similar a segregación de cromosoma 1 CSE1 (levadura)	2,09	0,0013662
Biosíntesis de anclaje de fosfatidilinositol glican, clase W	2,09	0,0151967
Proteína O de centrómero	2,09	0,00397056
Familia con similitud de secuencia 20, miembro B	2,09	0,00460031
Proteína FLJ40869 hipotética	2,09	0,00444509
Proteína de unión a nucleótido de guanina (proteína G), gamma 11	2,08	0,00140559
Proteína de unión a calciclina	2,08	0,00524566
Casete de unión a ATP, subfamilia E (OABP), miembro 1	2,08	0,00454751
Molécula CD44 (grupo de sangre india)	2,08	0,000651436
Componente 8 de exosoma	2,08	0,00132017
Familia con similitud de secuencia 102, miembro B	2,08	0,025743
Agrupación de histona 2, H3d	2,07	0,0102932

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Familia con similitud de secuencia 33, miembro A	2,07	0,000318673
Anemia de Fanconi, grupo B de complementación	2,07	0,000255109
Miembro 22 de familia de quinesina	2,07	0,0192406
Agrupación 1 de histona, H2ai	2,07	0,0161621
Quinasa 1 relacionada con vaccinia	2,06	0,0233182
Subunidad 7 del complejo integrador	2,06	0,000841371
Endonucleasa 1 específica de estructura de flap	2,06	0,006882
Proteína FLJ25416 hipotética	2,06	0,000177531
Sitio 2B de integración viral ecotrópica	2,06	0,0171408
Retinitis pigmentosa 2 (recesivo ligado a X)	2,05	0,0264185
Proteína L de centrómero	2,05	0,000880856
Cofactor requerido para la activación transcripcional de Sp1, subu	2,04	0,00141809
Pauta de lectura 121 abierta de cromosoma 20	2,04	0,0146323
Familia con similitud de secuencia 72, miembro A	2,04	0,00162905
Familia con similitud de secuencia 72, miembro A	2,04	0,00165234
Factor 1A de iniciación de traducción eucariota, ligado a X	2,04	0,00520549
Factor de elongación, ARN polimerasa II, 2	2,03	0,0458007
ATPasa, Na+	2,03	0,0189108
Agrupación de histona 1, H3a	2,03	0,0244273
1 que contiene dominio brix	2,03	0,00981178
1 que contiene dominio sushi	2,03	0,0258164
Ectonucleosido trifosfato difosfohidrolasa 6 (putativo)	2,03	0,00423628
Fructosamina 3 quinasa	2,03	0,00470972
Síndrome de Bloom	2,02	0,0209259
Tubulina, alfa 1c	2,01	0,00862586
Factor 2 de transcripción E2F	2,01	0,0496479
Componente 2 de exosoma	2,01	0,00649147
Miembro 22 de familia quinesina	2,01	0,0242075
Homólogo LTV1 (<i>S. cerevisiae</i>)	2,01	0,00812652

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
S-acetiltransferasa de dihidrolipoamida (componente E2 de pyruv	2,01	0,00179011
Homólogo B de oncogen viral de leucemia de simio v-ral (relacionado con ras)	2,01	0,012225
Dedo RING y dominio 3de repetición WD	2,01	0,0013797
Annexin A1	2,01	0,0173578
Homólogo 2 elaC (<i>E. coli</i>)	2,00	0,00266504
Familia de aldehído deshidrogenasa 9, miembro A1	2,00	0,00911609
Tubulin, alfa 4a	2,00	0,0435427
Proteína de interacción con complejo poro nuclear	-2,00	0,00111223
Oculomedin	-2,01	0,00778869
Similar a quinasa relacionada con PI-3-quinasa SMG-1	-2,01	0,0356628
Autoantígeno golgi, pseudogen similar a subfamilia a golgin	-2,01	0,00770626
Que contiene repetición de espectrina, membrana nuclear 1	-2,01	0,00438469
Proteína de interacción con complejo poro nuclear	-2,01	0,00117582
Sushi, nidogen y dominios 1 similares a EGF	-2,01	0,00161129
Integrina, alfa V (receptor de vitronectina, alfa polipéptido	-2,02	0,00252702
Inhibidor 2B de quinasa dependiente de ciclina (p15, inhibe CDK4)	-2,04	0,0150268
4 similar a lisil oxidasa	-2,04	0,0120148
Proteína de interacción con complejo poro nuclear	-2,04	0,000213956
Calcio	-2,04	0,00657494
Calsyntenin 3	-2,04	0,00300887
Molécula de adhesión celular 1	-2,05	0,0261129
Familia 22 de vehículo de soluto (transportador de catión orgánico)	-2,05	0,0137275
3 que contiene dominio RUN y FYVE	-2,05	0,00387265
Glucosidasa, alfa; ácido (enfermedad de Pompe, almacenamiento di de glicógeno	-2,05	0,000418401
Proteína de interacción de complejo de poro nuclear	-2,05	0,00988632
Coactivador 1 de receptor nuclear rico en prolina	-2,06	0,0039587
Metalo endopéptidasa de membrana	-2,06	0,0152684
Proteína 21A dedo PHD	-2,06	0,00980401
Proteína de activación de Rho GTPasa	-2,06	0,00705186

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Homeobox B6	-2,06	0,00301714
Proteína de interacción de complejo de poro nuclear	-2,07	0,00032839
Receptor 1 de fosfolipasa A2, 180kDa	-2,07	0,00069343
Proteína de interacción de complejo de poro nuclear	-2,08	0,000352007
Homólogo 3 slit (<i>Drosophila</i>)	-2,08	0,02844
Proteína de interacción de complejo de poro nuclear	-2,09	0,000414309
Quinasa 6 dependiente de ciclina	-2,09	0,0456892
Dynamin 1	-2,09	0,00139674
Jumonji, dominio B interactivo rico en AT	-2,09	0,00861002
Unión a calcio y dominio 1 de hélice superenrollada	-2,09	0,00370041
Receptor del factor de crecimiento 1 similar a insulina	-2,09	0,00114467
Proteína de interacción del complejo de poro nuclear	-2,10	0,000377834
Molécula CD82	-2,10	0,0175517
Dominio de bromo adyacente a dominio de dedo de Cinc, 2B	-2,10	9,88 x10 ⁻⁵
---	-2,10	0,00666187
Synaptotagmin XI	-2,11	0,0129428
KIAA 1546	-2,11	0,000255634
Proto oncogen jun B	-2,12	0,0120169
Dedo 6 CXXC	-2,12	0,0277527
Proteína de interacción de complejo de poro nuclear	-2,14	0,00282604
Homólogo de Cdon (ratón)	-2,15	0,0350357
CLL célula B	-2,15	0,00343507
Proteína de interacción de complejo de poro nuclear	-2,15	0,00263888
Homólogo 1 del oncogen viral de leucemia murina de Abelson v-abl	-2,16	0,0136688
Proteína de interacción de complejo de poro nuclear	-2,16	0,00583397
Homólogo 1 de supresor de tumor FAT (<i>Drosophila</i>)	-2,18	0,0158766
Transformador 2 alfa	-2,18	0,012256
Quimerina (chimaerin) 1	-2,18	0,0287031
Proteína del factor 8 de EGF del glóbulo graso de la leche	-2,18	0,000987073

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Receptor de vitamina D (1,25-dihidroxitamina D3)	-2,19	0,000192208
Neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad que contiene Dominio jumonji 1A	-2,20	0,00090639
Protein quinasa 1 deficiente de lisina WNK	-2,21	1,57 x10 ⁻⁵
Protocadherina beta 14	-2,21	0,0103892
Proteína 2 de unión a cortactin	-2,21	2,28 x10 ⁻⁵
Regulador 1 de transcripción que contiene dominio WW	-2,22	0,0379899
Ciclina L1	-2,22	0,00831474
Factor nuclear de células T activadas, citoplásmico, calcine	-2,22	0,00786451
Homólogo de pellino (Drosophila)	-2,23	0,00939357
Autoantígeno golgi, pseudogen similar a subfamilia a golgin	-2,24	0,00603583
Pauta de lectura 10 abierta del cromosoma 7	-2,26	0,00738442
Autoantígeno golgi, pseudogen similar a subfamilia a golgin	-2,27	0,00320764
ARN 17 específico a cuerpo Cajal pequeño	-2,27	0,0301336
Proteína 2 de unión al factor beta de crecimiento transformante latente	-2,29	4,08 x10 ⁻⁵
Autoantígeno golgi, subfamilia a golgin, 8A	-2,29	0,0111179
Inhibin, beta A (activin A, activin AB alfa polipéptido)	-2,29	0,00877271
Familia 41 de vehículo de soluto, miembro 2	-2,30	0,00453672
Caja p1 de forkhead	-2,30	0,0463138
Metalopeptidasa 14 de matriz (insertado en membrana)	-2,31	1,93 x10 ⁻⁵
Factor 4 de transcripción	-2,31	0,0367869
Oncogen jun	-2,32	7,21 x10 ⁻⁵
Gen 1 transformante de la célula neuroepitelial	-2,33	0,0109689
Asporin	-2,33	0,000659873
Homólogo de oncogen viral de osteosarcoma murino v-fos FBJ	-2,35	0,0138624
Efrina-B2	-2,36	0,00611474
Repetición de WD y 1 que contiene caja SOCS	-2,36	0,0387851
Similar a dJ402H5.2 (proteína novedosa similar a wo	-2,36	0,00621503
Dominio PX que contiene serina	-2,38	0,000927628

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Colágeno, tipo VII, alfa 1 (epidermólisis bullosa, dystro	-2,38	0,00109233
Proteína 1 de unión a AE	-2,39	0,000105628
Homólogo de peroxidasa (<i>Drosophila</i>)	-2,40	0,00219049
Canal de calcio, dependiente de voltaje, tipo L, sub alfa 1C	-2,41	0,0189661
Región 1 del cromosoma del síndrome Prader-Willi	-2,45	0,0415526
Midline 1 (opitz)	-2,45	0,00130803
Proteína de interacción con complejo poro nuclear	-2,45	0,00354416
Pauta de lectura 54 abierta del cromosoma 1	-2,47	0,0186089
Proteína de transmembrana 16A	-2,48	0,0481085
Que contiene el dominio básico hélice-bucle-hélice, clase B, 2	-2,49	0,00270257
Proteína de interacción con complejo del poro nuclear	-2,50	0,00316496
Factor de transcripción I relacionado con runt (leucemia mieloide aguda)	-2,50	0,000607387
Proteína de dedo de Cinc 292	-2,50	0,029832
Proteína 2 de transmembrana rica en leucina de fibronectina	-2,51	0,0135122
Proteína de interacción con complejo de poro nuclear	-2,51	0,00283418
Canal regulado por voltaje de potasio, subfamilia G, miembro 1	-2,54	0,0244306
Interleuquina 19	-2,54	0,0310328
Factor de crecimiento transformante, beta 3	-2,54	0,0287865
3 similar a dihidropirimidinasa	-2,55	0,0165203
Autoantígeno golgi, subfamilia a golgin, 8B	-2,56	0,0121417
Proteína PR02012 hipotética	-2,57	0,00756704
Homeobox 2 SATB	-2,57	0,039781
2 similar a t-complejo 11 (ratón)	-2,57	0,0324227
Proteína de dedo RING 122	-2,57	0,0236621
Pauta de lectura 57 abierta del cromosoma 8	-2,59	0,00261522
Metalopéptidasa de ADAM con motivo de trombospondina tipo 1	-2,60	0,0113968
Sushi, factor tipo A de von Willenbrand, EGF y dominio de pentraxina	-2,63	2,23 x10 ⁻⁹
ST6 beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 2	-2,64	0,0216987
Dominio VPS10 relacionado con sortilina que contiene el receptor 2	-2,65	0,00936311

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Protocadherina beta 9	-2,66	0,0285124
Pauta de lectura 13 abierta del cromosoma 5	-2,67	0,00410172
Enah	-2,68	0,0077547
2 que contiene el dominio de decarboxilasa dependiente de piridoxal	-2,69	0,00683647
Similar a proteína de interacción con complejo de poro nuclear	-2,70	0,0187322
Proteína de interacción con complejo de poro nuclear	-2,70	0,00368967
Proteína de transmembrana 119	-2,70	0,00801387
Pauta de lectura 37 abierta del cromosoma 14	-2,70	0,0182453
Proteína que contiene repetición sushi, 2 ligado a X	-2,71	0,0253856
Dominio PDZ que contiene dedo RING 3	-2,71	0,00931014
Colágeno, tipo XII, alfa 1	-2,72	0,000204664
5 asociado a remodelación de matriz	-2,72	0,000317637
Colágeno, tipo V, alfa 1	-2,72	0,0166427
Proteína 2 relacionada con distrofina	-2,72	0,0137557
Casete de unión a ATP, subfamilia A (ABC1), miembro 1	-2,73	0,00131361
Trofinina	-2,77	0,00298044
Homólogo 3 de cornichon (Drosophila)	-2,78	0,0261738
Similar a proteína 1 de unión a formina	-2,78	0,00290401
Leucemia cerebral y aguda, citoplásmico	-2,78	0,0476919
Protein tirosin fosfatasa, receptor tipo, U	-2,80	0,0270428
Proteína MGC24103 hipotética	-2,82	0,0346673
Interferón inducido con dominio 1 de helicasa C	-2,83	0,0024839
Proteína de transferencia de fosfolípido	-2,84	0,00999206
Respuesta 3 temprana inmediata	-2,87	0,0152127
Respuesta 3 temprana inmediata	-2,87	0,0152127
Dominio 12 de metalopeptidasa ADAM (meltrin alfa)	-2,87	0,000870288
Glicoproteína 2A de vesícula sináptica	-2,88	0,00704212
Pauta de lectura 3 abierta del cromosoma 9	-2,88	0,00410177
Proteína de interacción con tioredoxina	-2,90	0,0135494

ES 2 392 729 T3

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Respuesta de crecimiento temprano 1	-2,93	0,000425035
ARN nucleolar pequeño, C	-2,94	0,00666866
ARN nucleolar pequeño, C	-2,95	0,00765575
Respuesta temprana inmediata 3	-2,99	0,0167309
Proteína 1 relacionada con lipoproteína de baja densidad (alfa-2-macroglo	-2,99	4,26 x10 ⁻⁵
Homólogo 1 de C bicaudal (<i>Drosophila</i>)	-2,99	0,0347162
Homeobox B2	-3,03	0,00665994
ARN nucleolar pequeño, C	-3,10	0,0274043
ARN nucleolar pequeño, C	-3,10	0,0274043
Metalopéptidasa de matriz 2 (gelatinasa A, 72kDa	-3,13	5,59E-05
Gelatinasa, KIAA1641	-3,14	0,00659194
Colágeno, tipo VI, alfa 3	-3,14	2,09E-06
Homeobox A2	-3,15	0,0435423
Dominios 2B SH3 y PX	-3,15	0,0244357
Colágeno, tipo VI, alfa 2	-3,16	0,0149554
Pauta de lectura 3 abierta del cromosoma 9	-3,21	0,0233723
ARN nucleolar pequeño	-3,24	0,0104491
ARN nucleolar pequeño	-3,24	0,0104491
---	-3,27	0,00488845
UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilga	-3,35	0,00964109
Hidroxilasa de colesterol 25	-3,38	0,0445558
KIAA1641	-3,40	0,013175
Proteína de dedo RING 144	-3,40	0,0135334
Versican	-3,41	0,023885
2 similar a angiopoyetina	-3,42	0,0245161
KIAA1641	-3,44	0,0170531
Homólogo B de oncogen viral de osteosarcoma de murine FBJ	-3,54	0,00025573
Similar a ADNc 1110018M03 de RINKEN	-3,59	0,00516476
Respuesta 2 de crecimiento temprano (Krox-20 homólogo, <i>Drosophila</i>)	-3,62	0,00821813

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Dachsous 1 (Drosophila)	-3,63	0,00697244
Miembro 26B de familia quinesina	-3,64	0,00363199
Homeobox 5 less distal	-3,66	0,000640157
Similar a proteína KIAA0220	-3,69	0,0302619
Receptor del factor de crecimiento 1 similar a insulina	-3,71	3,42 x10 ⁻⁵
Protein tirosin fosfatasa, receptor tipo, N	-3,77	0,0294569
KIAA1641	-3,85	0,0191782
Proteína que contienen repetición sushi, ligado a X	-3,85	0,00370941
Proteína 2 asociada microfibrilar	-3,91	0,0152901
Componente 1 de complemento, subcomponente s	-3,97	0,0395863
Molécula de CD24	-3,99	0,0340122
Homeobox B3	-4,02	0,0354368
Síndrome tricornofalangeal I	-4,02	0,00557712
Secuencia del síndrome de Kallmann 1	-4,04	0,000548703
17 que contiene repetición rica en leucina	-4,09	0,0263961
2 que contiene dominio plexin	-4,32	0,031799
Protein tirosin quinasa 7 PTK7	-4,42	0,000116114
Supervillin	-4,43	0,0412717
Proteína de dedo de Cinc 521	-4,58	0,00668815
Calbidin 2, 29kDa (calretinina)	-4,77	0,0290743
Familia de gen homólogo a ras, miembro J	-4,79	0,00197982
Integrina, alfa 11	-4,80	0,000390317
Odz, odd oz	-5,05	0,00172671
Proteína 32 de caja F	-5,52	0,0212957
Miembro 2 de familia raftlin	-5,72	0,0260454
Clusterin	-5,74	0,0303973
Neurotrimina	-5,79	3,78 x10 ⁻⁶
Proteína 1 de vía de señalización inducible WNT1	-5,86	0,000672342
Proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a insulina	-6,34	0,011614

Gen	Celligen frente a Plurix (veces de cambio)	Valor de p (tratamiento)
Sulfatasa 2	-6,34	5,88 x10 ⁻⁵
Proteína 4 asociada microfibrilar	-6,93	0,00155578
Molécula 2 de adhesión funcional	-7,07	0,0306758
1 que contiene el dominio de fibronectina tipo III	-7,29	0,0334696
Sarcoglicano, delta (glicoproteína asociada a distrofina de 35kDa)	-7,37	0,000881984
Hefaestina	-7,53	0,0123141
Inhibidor de la serpin peptidasa, clado F (antiplásmido alfa 2)	-7,66	0,00362941
Cistatina SN	-7,96	0,0496433
Hemicentina 1	-8,18	0,0461603
Tenascin C (hexabrachion)	-8,32	8,26 x10 ⁻⁵
Biglicano	-8,62	0,00161284
Transmembrana, ARN inducido por andrógeno de próstata	-11,20	0,000100935
Carboxipeptidasa E	-11,22	0,00738131

- 5 **Expresión de marcadores celulares sobre células PLX-C**-Los antígenos de superficie expresados por PLX-C se examinaron usando anticuerpos monoclonales. Los resultados indicaron que las células PLX-C se caracterizaban por los marcadores positivos: CD73, CD29 y CD105 y los marcadores negativos: CD34, CD45, CD19, CD14 y HLA-DR (datos no mostrados). Las especificaciones del ensayo de fenotipo inmune se establecen como: ≥90% para todos los marcadores positivos y ≤3% para todos los marcadores negativos.
- Además, tal como se muestra en las Figuras 10A-B, los cultivos de PLX-C no expresaron marcadores endoteliales como se muestra por la tinción negativa para los dos marcadores endoteliales CD31 y KDR. Sin embargo, era evidente la expresión de PLX-C de un marcador típico de fibroblasto (expresión de D7-fib, Figura 10C).
- 10 **Propiedades de inmunogenicidad e inmunomoduladoras de las células PLX-C**- Ya que las PLX-C están comprendidas de células adherentes derivadas de placenta, se espera que expresen HLA tipo I, la cual es expresada por todas las células del cuerpo y se sabe que inducen una respuesta inmune aloreactiva. HLA tipo II y otras moléculas coestimuladoras generalmente se expresan solamente sobre la superficie de las Células que Presentan Antígeno (APCs, del Inglés "Antigen Presenting Cells").
- 15 Para examinar la inmunogenicidad de las células PLX-C obtenidas, se realizaron la expresión de las moléculas coestimuladoras sobre la superficie de estas membranas celulares. El análisis FACS demostró la ausencia de CD80, CD86 y CD40 sobre las membranas celulares PLX-C (Figuras 11A-C). Además, PLX-C expresaron bajos niveles de HLA clase I como se detectó por tinción para HLA A/B/C (Figura 11D). La expresión de moléculas estimuladoras y coestimuladoras fue similar a MSCs derivadas de médula ósea (BM) (tal como se muestra en las Figuras 11A-D).
- 20 Para investigar más la inmunogenicidad así como las propiedades de inmunomodulación de las células PLX-C, se realizaron los ensayos de Reacción de Linfocito Mezclado (MLR). Tal como se muestra en la Figura 12A-B, las células PLX-C tanto escapan al aloreconocimiento como reducen respuesta de célula T reducida, medido por la incorporación de Timidina. Además, la reducción en la proliferación de linfocitos (evaluada por la medida CPM) fue superior al número de células PLX-C aumentadas (en una manera dependiente de dosis). Las PLX-C también redujeron la proliferación de linfocito después de los estímulos mitogénicos, tales como Concanalina A (Con A, Figura 12B) y Fitohemaglutinina (PHA), y estimulación no específica por anti-CD3, anti-CD28 (datos no mostrados).
- 25

5 Para investigar el mecanismo de acción por el cual PLX-C modula de manera inmune la proliferación de linfocito, y para ver si esta acción está mediada por la interacción célula a célula o la secreción de citoquinas, se estimularon las células mononucleares (MNCs) derivadas de PB mediante PHA que usa el método Transwell (el cual previene el contacto célula a célula pero permite la difusión de citoquinas entre los dos compartimentos). Los resultados mostraron que la inhibición de la proliferación se mantuvo incluso cuando se inhibía el contacto célula a célula (datos no mostrados).

10 **Secreción de citoquinas**-Tal como se ha representado anteriormente en la presente memoria, PLX-C reducen el índice de proliferación de linfocitos, probablemente a través de factores solubles. Se realizó una investigación adicional de las citoquinas secretadas por linfocitos en respuesta a PLX-C para esclarecer el mecanismo de acción de PLX-C. Tal como se representa en las Figuras 13A-B, el cultivo de células mononucleares con PLX-C reduce ligeramente la secreción de la citoquina pro inflamatoria $INF\gamma$ y reduce dramáticamente la secreción de $TNF\alpha$ (incluso en presencia de bajas cantidades de PLX-C). Además, después de la estimulación de lipopolisacáridos (LPS), la secreción de IL-10 de MNCs derivadas de PB aumentó en presencia de PLX-C, mientras que el nivel de secreción de $TNF\alpha$ disminuyó, de una manera dependiente a dosis (Figura 13C).

Ejemplo 5

15 Biodistribución de PLX-C

Materiales y Métodos Experimentales

Transfección de células PLX-C con vector de expresión de Luciferasa

Las células PLX-C se infectaron de manera estable con una construcción lentiviral que expresa el gen de luciferasa bajo el promotor CMV (Figura 14).

20 Producción de virus infectados

25 Las células productoras 293TN se pusieron a crecer en un medio DMEM (Gibco) complementado con suero y antibióticos durante 2-3 días (confluencia al 50-70%) antes de la transfección. Una mezcla de 10 μ g de plásmido envasado y 2 μ g del constructor de expresión y 20 μ l de Reactivo Plus™ (Invitrogen) se añadieron a 400 μ l de DMEM sin complementos. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT) y Lipofectamine™ (se añadieron 30 μ l diluidos en 400 μ l de DMEM). La mezcla se incubó a RT durante 15 minutos. Las células 293TN se lavaron y se transfirieron a medios de suero al 2% y se añadió la mezcla de transfección. Las células se incubaron en incubadora de CO_2 a 37°C durante toda la noche y se recogió el medio 24-60 horas después de la infección. La producción pico de virus se alcanzó después de 48 horas. El medio se recogió, y se centrifugó a 3.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos para precipitar residuos celulares. Después de la centrifugación, se filtró el sobrenadante a través de los filtros PVDF de 0,45 μ m de Millex HV (Millipore, N° Cat. SLHVR25LS).

30 Infección de PLX-C

35 Se sembraron células PLX-C en una placa de 24 celdas a una densidad de $0,6-1 \times 10^5$ células por celda en medio completo 24 horas antes de la infección viral. Después de 24 horas, se añadió 0,5 ml de suspensión de virus (diluido en medio completo con Polybrene a una concentración final de 5-8 μ g/ml). Las células se incubaron durante 24 horas, a continuación el medio se reemplazó por medio DMEM completo y las células se incubaron a 37°C con CO_2 al 5% durante toda la noche. En el día 4, el cultivo alcanzó confluencia y se repartió por 1:3 a 1:5, se dejó que las células crecieran durante 48 horas en DMEM completo, a continuación, se analizaron las células para la expresión de Luciferasa.

40 Los índices de eficiencia de la infección eran de casi el 100%. La evaluación de la luminiscencia en células vivas y en ratones vivos se realizó usando el sistema IVIS Lumina Imaging, el cual incluía una cámara CCD altamente sensible que capturaba la señal luminiscente de la luciferasa.

Dos semanas después de la infección se inyectaron 2×10^6 células IM o IV en ratones SCID/Beige, NOD/SCID, SCID y Balb/C. Se hizo un seguimiento de las células inyectadas usando el sistema IVIS descrito.

Resultados Experimentales

45 Tal como es evidente a partir de los resultados, las células CXL continuaron dividiéndose después de la infección y los niveles de expresión de luciferasa en las células que crecían permanecieron fuertes y estables (Figura 15).

Una vez que se inyectaron las células PLX-C en ratones Balb/C, se examinó el patrón de biodistribución. Como es evidente a partir de los resultados, las células desaparecieron 72 horas después de la inyección IM (datos no mostrados). Sin embargo, las células PLX-C mantuvieron altos niveles constantes de expresión de luciferasa, *in vitro*,

durante aproximadamente tres semanas (datos no mostrados).

Tal como se muestra en las Figuras 16A-D, las células inyectadas IM en ratones inmunodeficientes de ratones SCID/Beige se retuvieron hasta 5 días en el sitio de la inyección y a continuación no se observaron. Las células CXL inyectadas IV en ratones SCID/Beige migraron después de 24 horas a los pulmones, a continuación al sitio de la inyección (presumiblemente recirculación al sitio de la lesión). Más tarde las células desaparecieron gradualmente y no se observaron después de 3-4 semanas.

Ejemplo 6

Las células adherentes son capaces de tratar la isquemia de miembro *in vivo*

Para determinar si el implante de células adherentes derivadas placentarias pueden reducir el daño isquémico y mejorar las funciones clínicas y motoras, se usó el modelo de isquemia de miembro trasero, tal como sigue.

Materiales y Métodos Experimentales

Modelo de isquemia de miembro trasero- La isquemia de miembro posterior se indujo en 20 ratones Balb/c machos, los cuales no son inmunodeficientes, a la edad de 8-10 semanas, el peso corporal aproximadamente 25 g±20%. La manipulación de los animales fue de acuerdo con la "National Institute of Health" (NIH) y la "Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care" (AAALAC). Los animales se almacenaron bajo condiciones estándar de laboratorio. Los animales se mantuvieron en un ambiente controlado por clima. El intervalo de temperaturas estaban entre 20-24°C y la humedad relativa (RH, del Inglés "Relative Humidity") estaba entre 30-70% con ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Los animales se aleatorizaron usando un programa de aleatorización generado por ordenador "Research Randomizer" y se dividió en 2 grupos de 10 animales. Un grupo recibió inyección intramuscular (IM) de 1×10^6 células adherentes derivadas placentarias (PLX-C) y el otro grupo sirvió como control y se inyectó con PBS.

Procedimientos Quirúrgicos- Se realizó una incisión de 1-1,5 cm en la piel en el área inguinal. Se ligó dos veces la arteria femoral con seda 6-0 y se cortó transversalmente a la ligadura. La herida se cerró con seda 3-0 y se dejó que los ratones se recobraran. Cinco horas de la escisión post operatoria de una arteria femoral, los ratones recibieron una inyección IM de 1×10^6 células adherentes derivadas placentarias (PLX-C) en un volumen total de 50 µl en 2 sitios de administración. Los animales del grupo control se inyectaron idénticamente con PBS (Gibco), véase Tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Estudio Piloto de PLX-C en Modelo de Isquemia de Miembro Trasero de Ratón

Grupo de Ensayo	Tratamiento	Nº de Ratones por grupo	Dosis Celular	Lote	Tiempo de Sacrificio post dosificación 21 días
1	PLX-C i.m	n=10 ♂	1×10^6	C.G. 13.0	n=10 ♂
2	PBS i.m	n=10 ♂	0	N/A	n=10 ♂

Poner en práctica- Se midió el flujo de sangre en las piernas de ambos lados 3 veces consecutivas con un laser Doppler de no contacto justo después de la operación, y en los días 6, 9, 14 y 2 post operación, y se expresaron como la relación entre el flujo en el miembro isquémico y el del miembro normal [Tokai. J. et al.].

Evaluación macroscópica de la severidad isquémica- El miembro isquémico se evaluó macroscópicamente en los días 1, 6, 9, 14, 21, hasta la terminación del estudio usando escalas morfológicas graduadas para área necrótica; grado 0: ausencia de necrosis, grado I: necrosis limitante a dedos del pie (pérdida de dedos), grado II: necrosis que se extiende a un dorsum pedis (pérdida de pie), grado III: necrosis que se extiende al *crus* (pérdida de rodilla), grado IV: necrosis que se extiende a un muslo (pérdida total del miembro posterior)[Tokai. J. et al.].

Valoración *in vivo* de la función del miembro y del daño isquémico- La valoración semicuantitativa del uso defectuoso del miembro isquémico se realizó de manera serial tal como sigue: 3=arrastre del pie, 2=no arrastre pero no flexión plantar, 1=flexión plantar y 0=flexionado de los dedos del pie para resistir la tracción suave del rabo (Rutherford et al., 1997).

Análisis molecular y bioquímico- Además de la evaluación clínica, se obtuvieron muestras moleculares y bioquímicas en el día 21 y actualmente están siendo analizadas para entender mejor los mecanismos moleculares que subyacen en la curación mejorada en el grupo inyectado con células adherentes derivadas placentarias (PLX-C).

Resultados experimentales

El implante de células adherentes derivadas placentarias induce significativamente el flujo sanguíneo en la cadera y el pie del modelo del miembro trasero isquémico- Para ensayar la eficacia de las células adherentes *in vivo*, los ratones se sometieron a ligadura de arteria seguido por inyecciones intramusculares de las células adherentes derivadas placentarias y el flujo sanguíneo se midió en la caderas y pie (ambos lados del cuerpo) usando un láser Doppler de no contacto a un periodo de tiempo predeterminado después del tratamiento. Tal como se muestra en la Figura 17, la inyección de flujo sanguíneo (BF, del Inglés "Blood Flow") marcadamente mejorado por PLX-C al miembro dañado, tal como se determinó por las valoraciones del flujo sanguíneo, aumenta la función del miembro, aumenta la densidad capilar, disminuye el estrés oxidativo y daño endotelial. En términos del flujo sanguíneo, el efecto se demostró 9 días después de la inyección y se observó durante todo el estudio entero. En el grupo tratado con PLX-C, BF aumentó desde $24 \pm 2,3$ a $80 \pm 4,7\%$, mientras que en el grupo tratado con vehículo control BF estaba en el intervalo de 35 ± 2 a $54 \pm 4,5\%$ -en el área de cadera/implante (día 0 frente día 21, respectivamente). Similarmente al área de rabo, pero a una extensión menor, también se demostró un aumento en BF en el área de pata de los ratones tratados con PLX-C.

Por tanto, en el grupo tratado vehículo BF aumentó desde $12 \pm 0,6$ a $46 \pm 4,9\%$, mientras que en el grupo de PLX-C BF aumentó desde $10 \pm 0,7$ a $52 \pm 5,5\%$ (día 0 frente a día 21 respectivamente), tal como se muestra en la Figura 17.

Las células adherentes son capaces de mejorar la función de miembro *in vivo*-Para evaluar más los efectos *in vivo* de las células adherentes derivadas placentarias, se valoraron las funciones del miembro en los ratones tratados usando el sistema de puntuación descrito bajo Materiales y Métodos Experimentales, anteriormente en la presente memoria. Tal como se muestra en la Figura 18, los ratones tratados con las células adherentes presentaron un mejoramiento significativo en la función del miembro ($2,5 \pm 0,2$ frente $2,1 \pm 0,2$ control frente a grupo con PLX-C, respectivamente, tomar nota del efecto significativo en el día 21 después del tratamiento). Sin embargo, el grado de mejoramiento en la función del miembro durante los 21 días de observación fue comparable, sugiriendo que las PLX-C, bajo las condiciones del presente estudio no presentaron un cambio muy importante de la recuperación de la función.

La valoración macroscópica de la severidad isquémica reveló que en el grupo tratado con vehículo control, la necrosis limitada a los dedos del pie se observó en dos animales en el día 6. En el grupo tratado con PLX-C, la necrosis limitada a los dedos del pie, se demostró solamente en un animal y solamente después de 14 días. Los análisis inmunohistoquímicos post mortem de los miembros tratados con PLX-C indicaron un aumento significativo en el número de los nuevos capilares (vasos) que abastecen el miembro y sugiriendo que las PLX-C poseen la capacidad de promover la angiogénesis (Figura 19).

Finalmente, se observaron un estrés oxidativo disminuido y una reducción en la inflamación endotelial (la cual era un parámetro suculáneo para la función endotelial mejorada) en los animales tratados en los ratones tratados con PLX-C (Figuras 20A-B). Esto fue probable debido al suministro de oxígeno aumentado en los ratones tratados con células PLX-C, pero no en ratones control tratados con PBS.

En conclusión, cuando se compararon con el control, los ratones inyectados con PBS, ninguno de los ratones inyectados con PLX-C presentaban ningún signo o síntoma clínico adverso en respuesta a la administración celular intramuscular (i.m.). Por tanto, PLX-C induce un aumento en el flujo sanguíneo, resultando probablemente de la angiogénesis como soportado por la evaluación histológica del miembro dañado. Además, el retraso en el desarrollo de la necrosis y la diferencia en el número de los animales afectados son sugerentes de una respuesta clínica.

Implante de células adherentes derivadas placentarias

Otro estudio de eficacia se llevó a cabo en ratones Balb/C que comprenden puntos importantes de seguridad (es decir, la necrosis gorda y análisis histopatológico de órganos seleccionados) tal como se describió anteriormente en la selección de Materiales y Métodos.

En este estudio, siete grupos de ratones, consistiendo cada uno de 10 ratones Balb/c machos (miembro trasero isquémico) se usaron como se detalla en la Tabla 7, a continuación en la presente memoria. Un grupo sencillo de 10 ratones no tenían isquemia inducida (para ensayar la completa seguridad y tolerabilidad de células PLX-C en animales normales, sanos). Después de la inducción de isquemia, el tampón control o células PLX-C se administraron i.m. al miembro afectado, y los ratones se observaron durante hasta 1 mes después de la dosificación. Un grupo sencillo de ratones recibieron dos inyecciones separadas en el miembro afectado, separadas por 1 semana (Días 1 y 8). Se hizo un seguimiento del flujo sanguíneo mediante análisis de Laser Doppler, y la severidad isquémica se valoró macroscópicamente y comportamentalmente fuera de 30 días post dosis, en dicho tiempo, los ratones se sacrificaron, y los tejidos se retuvieron para el análisis histológico.

Tabla 7: Estudio de Eficacia de PLX-C en Modelo de Isquemia de Miembro Trasero de Ratón

Nº Grupo de ensayo	Tratamiento	Cantidad Celular (Dosis)	Número de Tratamientos	Lote	Tiempo de Sacrificio Post dosificación 30 días
1	PLX-C	1x10 ⁶	1	C.G. 13.0	10♂
2	PLX-C	1x10 ⁶	1	C.G. 25.0	10♂
3	PLX-C	1x10 ⁶	2	C.G. 25.0	10♂
4	PLX-C	0,5x10 ⁶	1	C.G.13.0	10♂
5	PLX-C	0,1x10 ⁶	1	C.G.13.0	10♂
6	Medio de Congelación Control	N/A	1	N/A	10♂
7*	PLX-C	1x10 ⁶	1	C.G.13.0 C.G.25.0	10♂

En este estudio, se administraron diferentes lotes de PLX-C a tres concentraciones. Los resultados mostraron que 0,1x10⁶ y 0,5x10⁶ PLX-C tenían un beneficio terapéutico menor. Se observó un notable mejoramiento en el flujo sanguíneo por en día 29 (final del experimento) en los animales tratados con 1x10⁶. Este mejoramiento en el flujo sanguíneo fue significativo (p<0,05) en grupo 2M (lote G.C25) en comparación con ratones inyectados con vehículo control. Adicionalmente, una segunda inyección del mismo lote de células mejoraron significativamente BF en el día 15 en comparación con la inyección sencilla (55±24 comparado con 31±12,9 y 27±12,5%, respectivamente). La valoración macroscópica de la severidad isquémica reveló que había una tendencia al mejoramiento en los grupos que reciben 1x10⁶ (1M & 2M) en comparación con el grupo tratado con vehículo control (6M).

Juntos, estos resultados demuestran que la eficacia de las células adherentes en la inducción de la vascularización (por ejemplo, flujo sanguíneo) y el mejoramiento de la función del miembro en el modelo de ratones isquémicos de miembro trasero y sugiere el uso de estas células (por ejemplo, células adherentes derivadas placentarias) para tratar enfermedades isquémicas de miembro.

Ejemplo 7

PLX-C para el tratamiento de apoplejía

El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia terapéutica del trasplante humano sistémico de células adherentes derivadas de placenta con PLX-C (intravenosa) en el tratamiento de apoplejía.

Materiales y Métodos Experimentales
Sujetos, cirugía y trasplante

Se usaron ratas espontáneamente hipertensas hembras, que sufrían de hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes y microangiopatías. Los animales se mantuvieron bajo condiciones constantes que conciernen temperatura, humedad del aire y ciclo luz/oscuridad. Los sujetos se asignaron en grupos experimentales al azar (véase tabla 8, a continuación).

5

Tabla 8: Grupos de tratamiento de rata en el tratamiento de apoplejía

Nº Grupo	Tratamiento	Nº de animales
1	PLX-C, administración sencilla del lote 1	N=8
2	PLX-C, administración doble del lote 1	N=7
3	PLX-C, administración sencilla del lote 2	N=8
4	PLX-C, administración doble del lote 2	N=7
5	Solución Vehículo Control	N=12

Los animales recibieron una dosis sencilla o doble de 1×10^6 PLX-C de lotes diferentes. Todos los procedimientos de trasplante se condujeron intravenosamente. El grupo inyectado doble se trasplantó 10 y 24 horas después de la isquemia cerebral, mientras que los trasplantes sencillos se realizaron 24 horas sobre la apoplejía. Todas las células trasplantadas se marcaron previamente con el tinte de fluorescencia PKH26.

10 La isquemia cerebral experimental se condujo vía la oclusión permanente de la arteria cerebral derecha. Digno de mención, un animal murió después de la anestesia.

Investigación de Resonancia Magnética (MRI, del Inglés “Magnetic Resonance Investigation”)

15 La MRI del desarrollo de la lesión se llevó a cabo los días 1, 8, 29 y 60 usando un escáner 1,5T (Phillips). Se midieron la volumetría de infarto y la atrofia cerebral y se calculó por medio de valores obtenidos por tres investigadores ciegos usando secuencias T2 coronales.

Ensayos de la conducta

20 Se midieron los cambios funcionales usando dos Arrays de ensayo de la conducta dependiente. El ensayo de Caminar por la Barra de Equilibrio es un ensayo normal usado para cuantificar las deficiencias sensor-motoras. Las ratas se acondicionaron para correr a través de una barra montada en horizontal con la jaula hogar de la rata al final. El tiempo de tránsito se midió durante cinco veces y se documentó como valor medio diario. El colgarse de la barra de equilibrio se valoró con 20 segundos y la caída con 30 segundos. Las medidas se tomaron lugar diariamente durante la primera semana y cada séptimo día hasta el final del periodo de observación.

25 El segundo ensayo, el resultado de la gravedad neurológica modificada (mNSS, del Inglés “Modified Neurological Score”) contenía asuntos sensoriales, motores y de reflejo. El resultado de la mNSS se expresó como una puntuación entre 1 y 18, mientras que los puntos entre 1 y 6 implicaban una lesión media, 7 a 12 una moderada y 13 a 18 una grave. La evaluación de la puntuación de mNSS se realizó en los días 1, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 después de la isquemia cerebral.

Histología

30 Posterior al final del periodo experimental, todas las ratas se sacrificaron y se sometieron a perfusión transcardialmente con disolución de formalina al 4%. Se crioconservaron los cerebros extraídos y se cortaron en secciones de 30 μ m de grosor. Para la tasación de la reacción glial, se realizó una investigación inmunohistoquímica con anticuerpo primario frente a GFAP. Un área de 750 μ m de ancho se examinó (semicuantitativamente) cerca al borde del infarto para la densidad de las células GFAP+. Para la inspección de la reactividad astrogliar, 15 regiones donde se incluían con interspacios promedios de 0,6 mm.

35 **Estadísticas**

Se investigó la distribución Gaussiana de todos los datos que conciernen al peso, análisis MRI y reconocimientos histológicos y se analizaron las diferencias estadísticamente significativas usando la ANOVA y por consiguiente la ANOVA en rangos.

Los datos recogidos en el ensayo de Caminar sobre la Barra de Equilibrio y mNSS se sometieron a análisis estadístico detallado teniendo en cuenta medidas repetidas de sujetos así como el desarrollo temporal de sujetos individualmente (análisis estratificado). Para equilibrar las diferencias inter individuales que conciernen al grado de daño cerebral se usó un modelo de interceptar al azar. Por lo tanto, los datos recogidos dentro del ensayo de Caminar sobre la Barra de Equilibrio tuvieron que transformarse a un sistema categórico. En la presente memoria, los valores de tiempo de menores de 5 segundos se consideraron como categoría (0), de 5 a 10 segundos como categoría (1), de 10 a 15 segundos como categoría (2), 15 a 20 segundos como categoría (3), colgarse como categoría (4) y caída como categoría (5).

Resultados Experimentales

10 **Peso**

El pesado periódico permitió una buena estimación del estado general de salud del sujeto. Una reducción inicial del peso se observó en todos los grupos debido a la anestesia y a la intervención quirúrgica (datos no mostrados). Posteriormente, se observó una rápida normalización de peso y un transcurso estable hasta el final del experimento en el día 60 (datos no mostrados). Los grupos experimentales mostraron una progresión homóloga del peso corporal.

15 **Ensayo de Caminar sobre la Barra de Equilibrio**

Todos los grupos experimentales mostraron una reducción significativa de las categorías de Caminar sobre la Barra de Equilibrio durante el transcurso del experimento (datos no mostrados). Se observaron un significativo descenso menor de las categorías de Caminar sobre la Barra de Equilibrio en el grupo experimental 1 (administración sencilla del lote 1 de PLX-C) en comparación con el grupo control (-0,01247 frente a -0,02931, respectivamente). No hubo evidencias de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental 3 (administración sencilla del lote 2 de PLX-C) y el grupo control (datos no mostrados).

20 **Puntuación de la Gravedad Neurológica Modificada (mNSS)**

Todos los grupos experimentales manifestaron una reducción significativa de los puntos de puntuación neurológica (datos no mostrados). Comparando los resultados de mNSS de los sujetos tratados con PLX-2 (administración doble de PLX-C) revelaron una superioridad estadísticamente significativa en comparación con el grupo control. El trasplante por duplicado del lote 2 (grupo 3) mostró un mejoramiento significativo en el ensayo de mNSS en comparación con la inyección sencilla del mismo lote (datos no mostrados).

25 **Volumetría de infarto**

Obtener imagen de la resonancia magnética es un método altamente sofisticado para estimar el grado de daño cerebral y la pérdida de tejido *in vivo*. Tomando las fluctuaciones inter individuales en consideración, se anotó el desarrollo del volumen de infarto como el porcentaje del volumen de infarto en el día 1, individualmente. El volumen de infarto en el día 1 no difirió significativamente entre los grupos experimentales. El desarrollo general del volumen de infarto manifestó un descenso aproximado del 50% entre el día 1 y el día 8. Esto fue principalmente debido a una retrogresión del edema cerebral inicial. El examen del desarrollo de la lesión *in vivo* usando MRI reveló que los sujetos del grupo 4 (administración doble del lote 2 de PLX-C) mostraron un significativo cociente infarto reducido el día 60 ($0,48 \pm 0,02$ frente a $0,60 \pm 0,03$, respectivamente, (resultados no mostrados).

Tomados juntos, estos resultados indican que la administración intravascular de PLX-C daba como resultado un mejoramiento significativo de la recuperación funcional en ambos ensayos de la conducta en el tratamiento de la apoplejía. Además, se observó una considerable y también estadísticamente significativa superioridad de los trasplantes dobles de PLX-C en comparación con la inyección sencilla análoga.

Una corroboración de los mejoramientos de conducta medidos por MRI fue evidente en los sujetos tratados dos veces con PLX-C. Además, se observó una reducción significativa del volumen de infarto y la atrofia cerebral al final del experimento. Además, en ambos ensayos funcionales se observó un mejoramiento estable de la recuperación funcional después del trasplante de doble dosis de PLX-C en comparación con los controles y efectos no comprobables sobre las inyecciones sencillas.

Ejemplo 8

Tratamiento de las patologías que requieren de regeneración y/o reparación de tejido conectivo

Tratamiento de patologías que requieren de regeneración y/o reparación de hueso usando las células adherentes de la invención

Se usan modelos animales (por ejemplo, conejos blancos maduros de Nueva Zelanda) para examinar el efecto de las células adherentes de la invención (las cuales se derivan de la placenta o del tejido adiposo y se obtienen de un cultivo 3D, por ejemplo, células PLX-C) sobre la curación de defectos segmentales de tamaño crítico en los fémures. Los animales se asignan al azar a uno de los tres grupos. Los animales del grupo A, se inyectan con $1-10 \times 10^6$ de las células adherentes (células PLX-C) en el sitio del defecto. Los animales del grupo B se inyectan con PBS. En los animales del grupo C, el defecto se deja sin tratar. Las radiografías se hacen inmediatamente después de la operación y en intervalos de una semana. A las 12 semanas, se sacrifican los animales, se separan los fémures implicados, y se preparan secciones histológicas descalcificadas de los defectos y hueso adyacente. Se llevan a cabo estudios mecánicos, histológicos y histomorfométricos para examinar la curación de los defectos y la formación de hueso en y alrededor del sitio con el defecto. Además se realiza una reacción en cadena con polimerasa de transcripción inversa para detectar el ARNm de colágeno tipo I y tipo II.

Tratamiento de patologías que requieren de regeneración y/o reparación de tendón usando las células adherentes de la invención

Se usan modelos animales (por ejemplo, conejos blancos de Nueva Zelanda esqueléticamente maduros) para examinar el efecto de las células adherentes de la invención (por ejemplo, células PLX-C) en la curación de tendones. Los tendones hallucis longus se trasladan en túneles de hueso calcáneo de 2,5 mm de diámetro. Los túneles de hueso se tratan con o sin PLX-C. Los animales se asignan al azar a uno de los tres grupos. Los animales del grupo A, se inyectan con $1-10 \times 10^6$ células PLX-C en el sitio del defecto o IV. Los animales del grupo B se inyectan con PBS. En los animales del grupo C, el defecto se deja sin tratar. Se recogen tres especímenes de cada grupo en las semanas 2, 4 y 6 después de la operación y la evaluación para las características morfológicas de la curación del tendón para la interfaz de hueso se realiza mediante el uso de la histología convencional y la localización inmunohistoquímica del colágeno Tipos I, II y III.

Tratamiento de patologías que requieren de regeneración y/o reparación de cartílago usando las células adherentes de la invención

Se usan modelos animales (por ejemplo, conejos blancos de Nueva Zelanda esqueléticamente maduros) para examinar el efecto de las células adherentes de la invención (por ejemplo, células PLX-C) en la curación del cartílago. Se realiza un defecto de grosor completo del cartílago articular del surco patelar del fémur distal izquierdo. Un colgajo de aproximadamente 6 mm se separa de la fascia por encima del musculo cuádriceps y se sutura al borde periférico del defecto artificial con catgut 6-0. Los animales se asignan al azar a uno de los tres grupos. Los animales del grupo A se inyectan con $1-10 \times 10^6$ células PLX-C en el sitio del defecto o IV. Los animales del grupo B se inyectan con PBS. En los animales del grupo C, el defecto se deja sin tratar. Los animales se sacrifican. Catorce semanas después del implante de las células PLX-C sobre el defecto osteocondral, se someter a resección los fémures distales y se realiza la evaluación histológica y los especímenes se clasifican semicuantitativamente en base a la naturaleza predominante del tejido reparado, la tinción de la matriz, la regularidad de la superficie, la integridad estructural, el grosor de la reparación, la yuxtaposición entre el cartílago reparado y el cartílago normal circundante, la libertad de las señales degenerativas en el tejido reparado y la libertad de los cambios degenerativos del cartílago normal circundante.

Tratamiento de patologías que requieren de regeneración y/o reparación de ligamento usando células adherentes de la invención

Se usan modelos animales (por ejemplo, conejos blancos de Nueva Zelanda esqueléticamente maduros) para examinar el efecto de las células adherentes de la invención (por ejemplo, células PLX-C) en la curación del ligamento. Se realizarán defectos circulares unicorticales de 8 mm en diámetro. Los animales se asignan al azar a uno de los tres grupos. Los animales del grupo A se inyectan con $1-10 \times 10^6$ células PLX-C en el sitio del defecto o IV. Los animales del grupo B se inyectan con PBS. En los animales del grupo C, el defecto se deja sin tratar. Los animales se sacrifican catorce semanas después del implante de las células PLX-C sobre el defecto oligamental. Se realizan evaluaciones histológicas y los especímenes se clasifican semicuantitativamente en base a la naturaleza predominante del tejido reparado.

Se apreciarán que ciertas características de la invención, las cuales, para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación con una realización sencilla. A la inversa, diversas características de la invención, las cuales, para mayor brevedad, se describen en el contexto de una realización sencilla, también pueden ser proporcionadas separadamente o en una subcombinación adecuada.

Aunque se ha descrito la invención en conjunto con las realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán aparentes a los expertos en la técnica.

REFERENCIAS

(Las referencias adicionales son citadas en el texto)

- Bauer, Thomas W., Muschler, George F., Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 371:10-27, Febrero de 2000.
- 5 Carstanjen B., Desbois C., Hekmati M., y Behr L. Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. *Can J. Vet. Res.* Abril de 2006; 70 (2):143-147.
- Bruder SP., et al., 1998. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J. Bone Joint Surg. Am.* 80(7):985-96.
- 10 Chao Wan, Qiling He, Gang Li, 2006. Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model. *Journal of Orthopaedic Research* 24 (4):610-618.
- Herthel D.J. 2001. Enhanced Suspensory Ligament Healing in 100 Horses by Stem Cells and Other Bone Marrow Components. *AAEP PROCEEDINGS/Vol.* 47.
- Gordon et al., Tendon Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells. p313-320 in *Tendon Injuries*. Springer London. 2005
- 15 Horwitz et al., 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med.* 5:309-313.
- Horwitz et al., 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone PNAS 99(13)8932-8937.
- 20 Livingston, T.L. 2003. Mesenchymal stem cells combined with biphasic calcium phosphate ceramics promote bone regeneration. *Journal of Materials Science: Volumen* 14 (3):211-218.
- Young et al., 1998. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J. Orthop Res.* 16 (4):406-13.

REIVINDICACIONES

1. Células placentarias o adiposas adherentes para usarse en el tratamiento de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en isquemia, una afección que requiere de regeneración de tejido conectivo y una afección que requiere de reparación de tejido conectivo.
- 5 2. Un artículo de producción que comprende un material de envasado el cual comprende una etiqueta para usarse en el tratamiento de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en isquemia, una afección que requiere de regeneración de tejido conectivo y una afección que requiere de reparación de tejido conectivo, envasando dicho material de envasado una cantidad farmacéuticamente efectivas de células placentarias o adiposas adherentes.
- 10 3. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 en la que dichas células son capaces de suprimir la reacción inmune en el sujeto.
4. Las células o artículo de producción de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 en la que al menos el 10% de dichas células adherentes están en una fase proliferativa.
- 15 5. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 en la que dichas células se propagan usando un cultivo tridimensional (3D).
6. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 en la que dichas células se propagan usando un cultivo bidimensional (2D).
7. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho cultivo tridimensional (3D) comprende un biorreactor 3D.
- 20 8. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con las reivindicaciones 5 ó 7, en la que el cultivo de dichas células en dicho cultivo 3D se efectúa bajo perfusión.
9. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho índice de perfusión se ajusta para mantener una concentración constante de glucosa en el medio de cultivo.
- 25 10. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha concentración constante de glucosa es de aproximadamente 550 mg/l.
11. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 7 a 10, en las que las condiciones de cultivo de dicho cultivo tridimensional comprende un material adherente seleccionado entre el grupo que consiste en un poliéster y un polipropileno.
- 30 12. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en las que dichas células comprenden una expresión de marcador positivo seleccionado entre el grupo que consiste en CD73, CD90, CD29 y CD105.
13. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en las que las células comprenden una expresión de marcador negativo seleccionado entre el grupo que consiste en CD3, CD4, CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34 y CD79.
- 35 14. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en la que dichas células adherentes comprenden un fenotipo de célula madre estromal.
15. Las células o artículo de producción para usarse de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en la que dicha isquemia se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad arterial periférica (PAD, del Inglés "Peripheral arterial disease") e isquemia de sistema nervioso central (CNS).

40

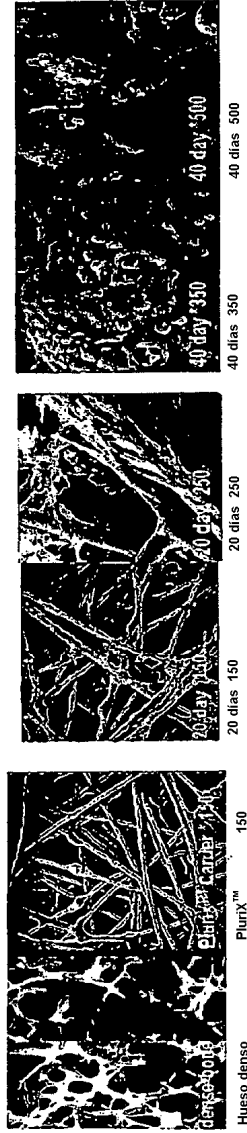


FIG. 1A FIG. 1B FIG. 1C FIG. 1D FIG. 1E FIG. 1F

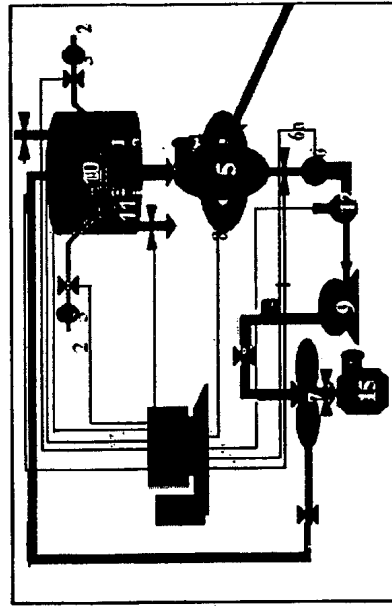


FIG. 1G

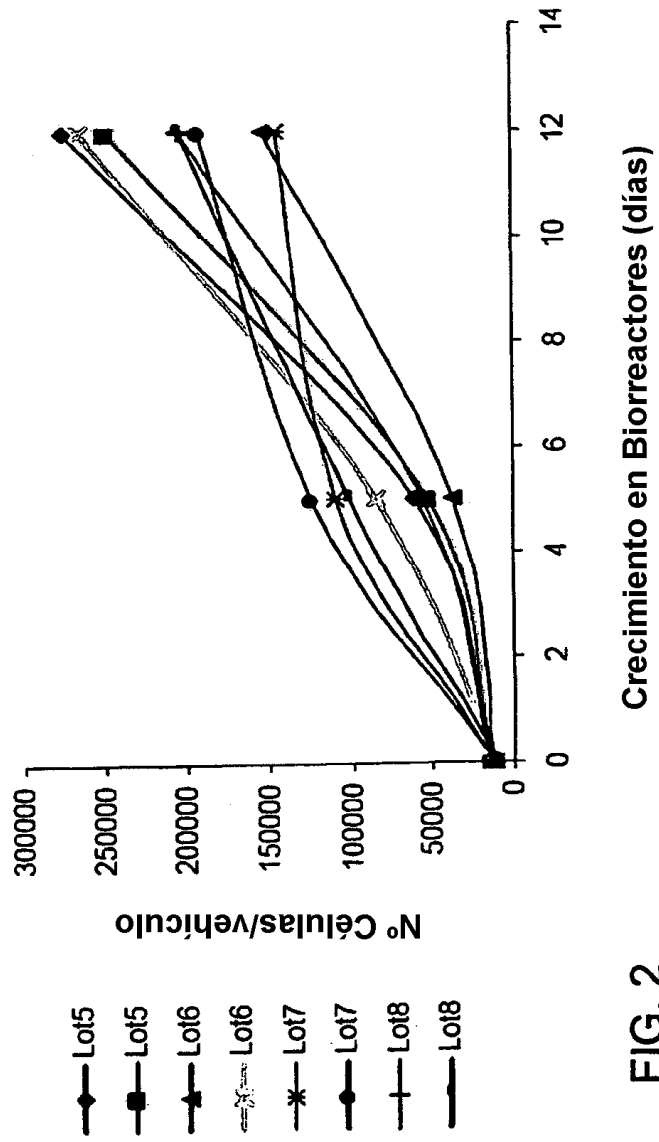


FIG. 2

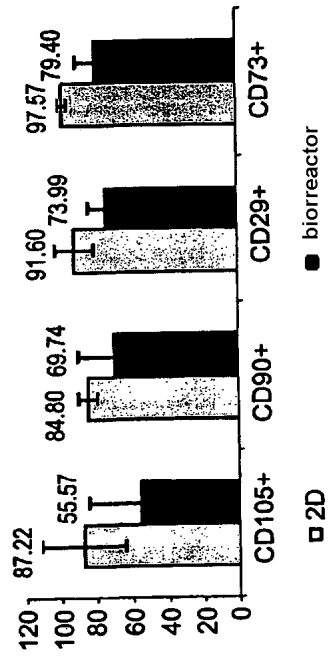


FIG. 3A

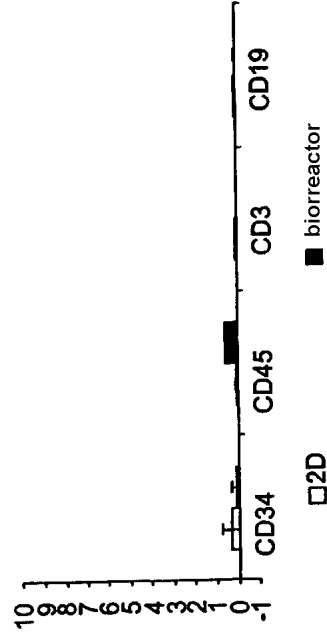


FIG. 3B

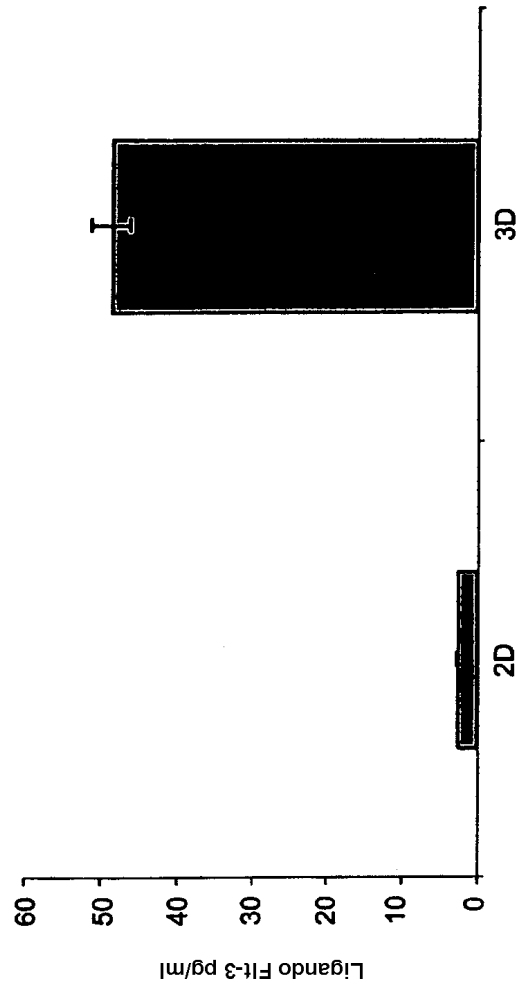


FIG. 4A

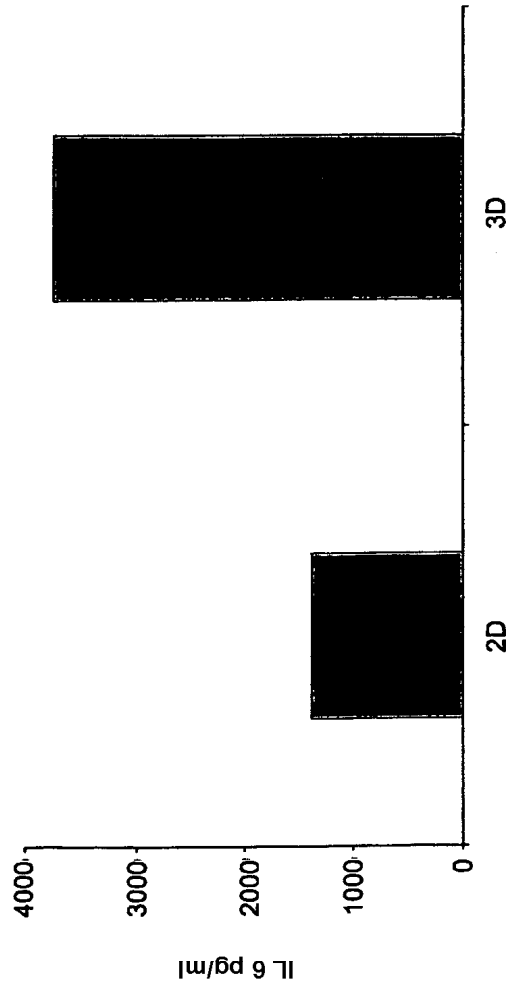


FIG. 4B

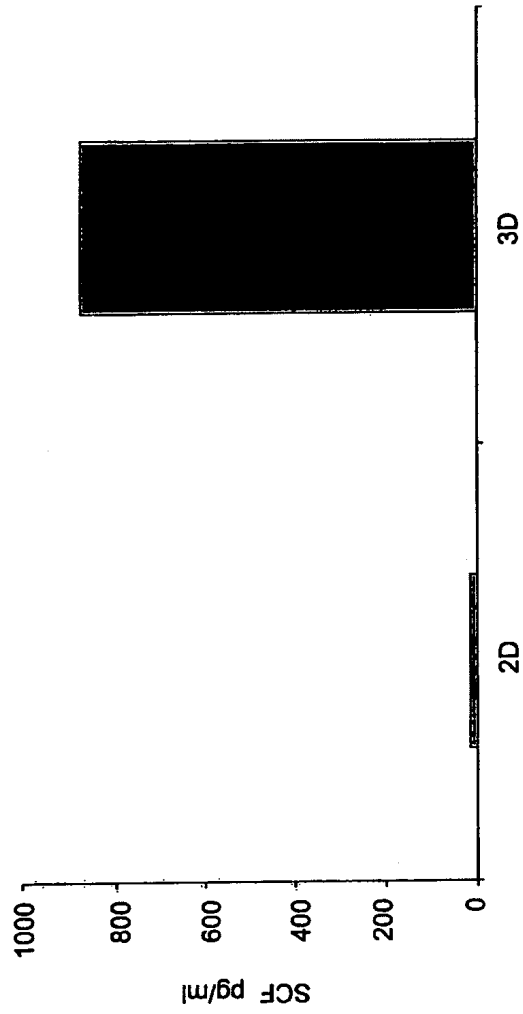


FIG. 4C

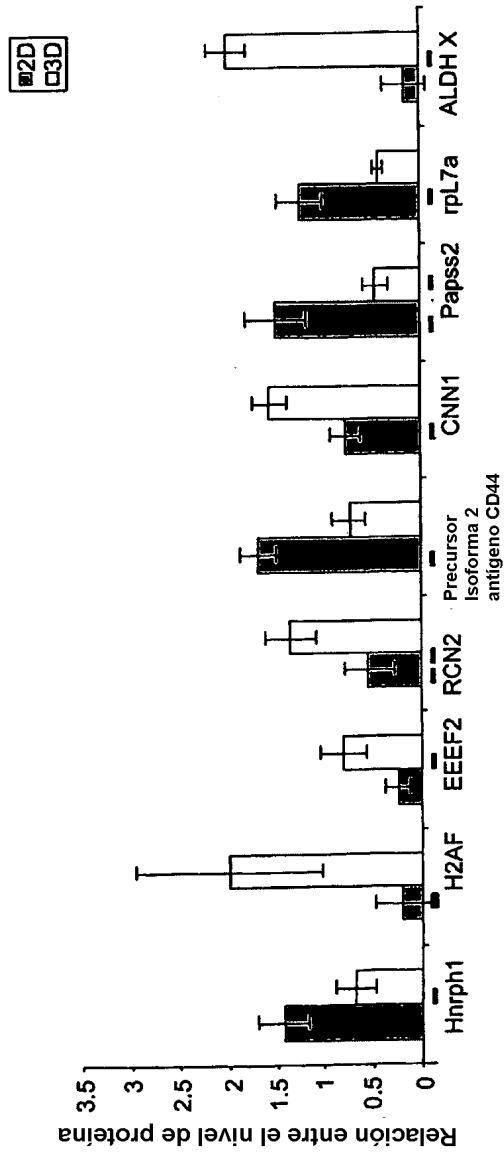


FIG. 4D

FIG. 5C

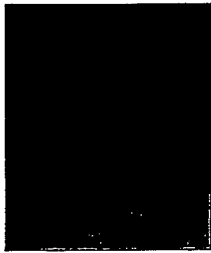


FIG. 5D

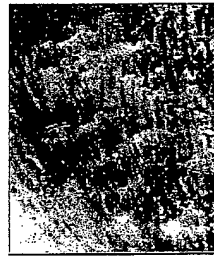


FIG. 5A



FIG. 5B



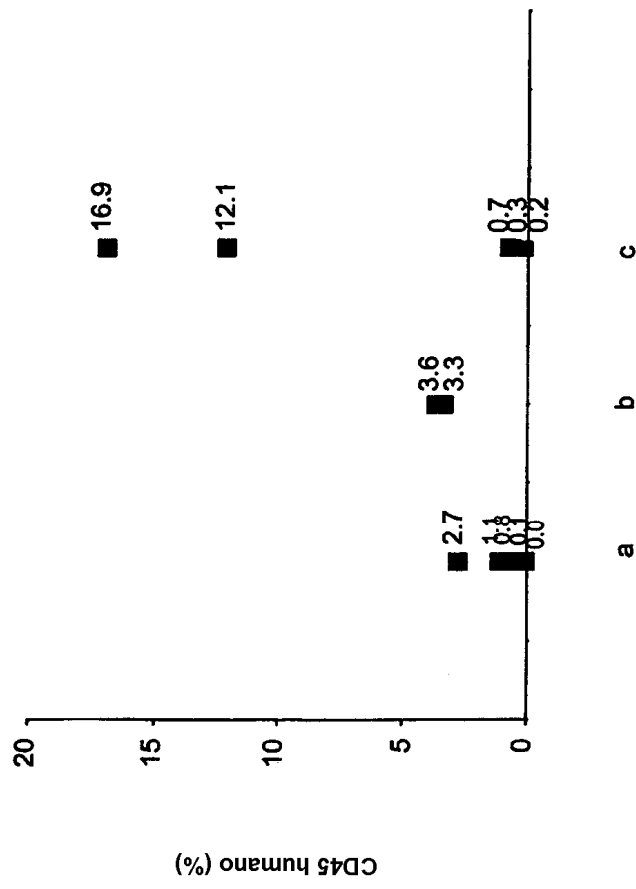
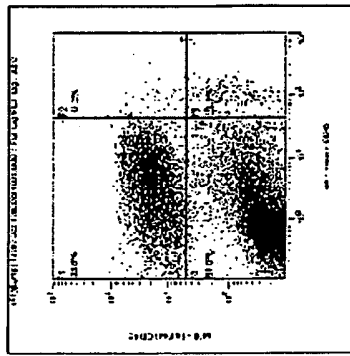
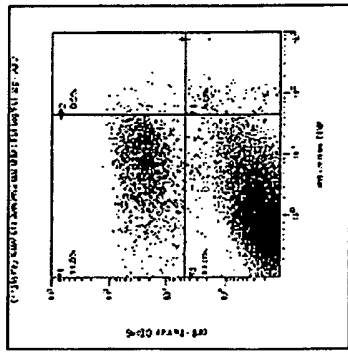


FIG. 6



Células		Leyenda	
Nombre	% Total	Número	Células/pl
anti CD45+ humano	29.13	1147	ERROR
anti CD45+ ratón	7.92	327	ERROR
Limf	100.00	55.88	1141



Células		Leyenda	
Nombre	% Total	Número	Células/pl
anti CD45+ humano	11.91	481	ERROR
anti CD45+ ratón	4.46	179	ERROR
Limf	100.00	31.03	1142

CD45+ Humano (%)
CD45+ de Ratón (%)

FIG. 7B

FIG. 7A

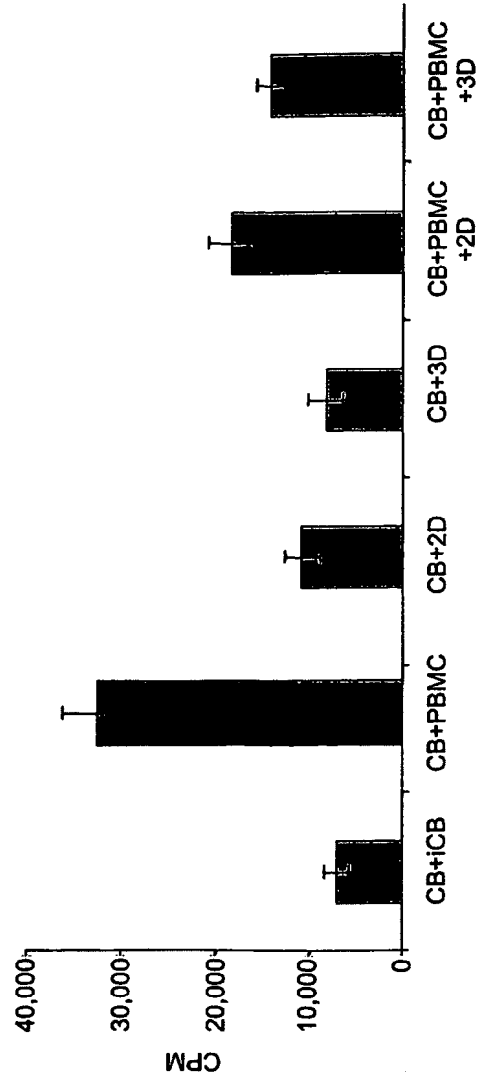


FIG. 8A

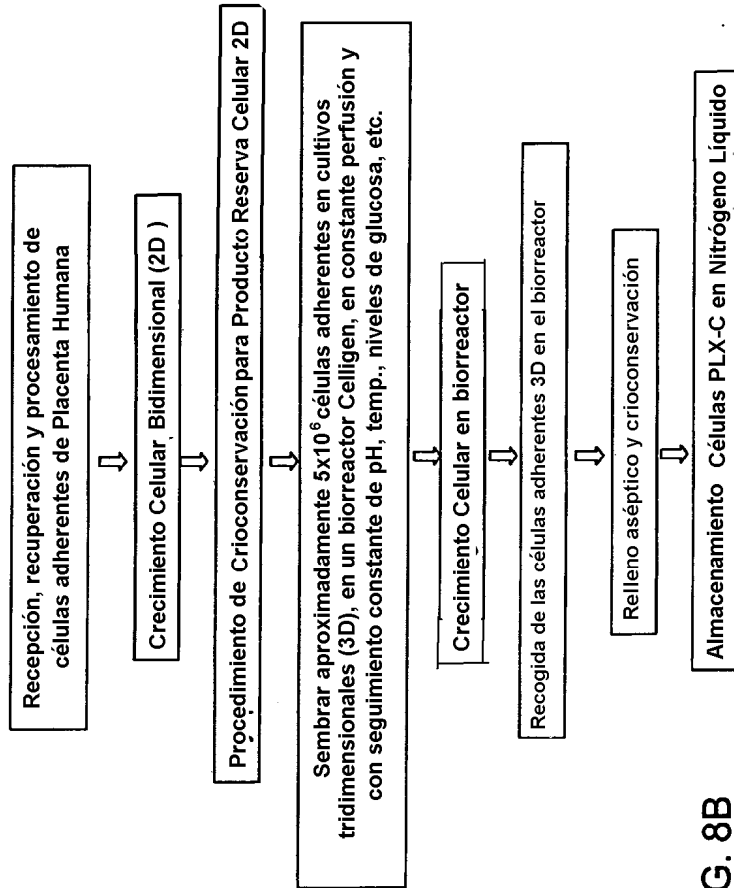


FIG. 8B

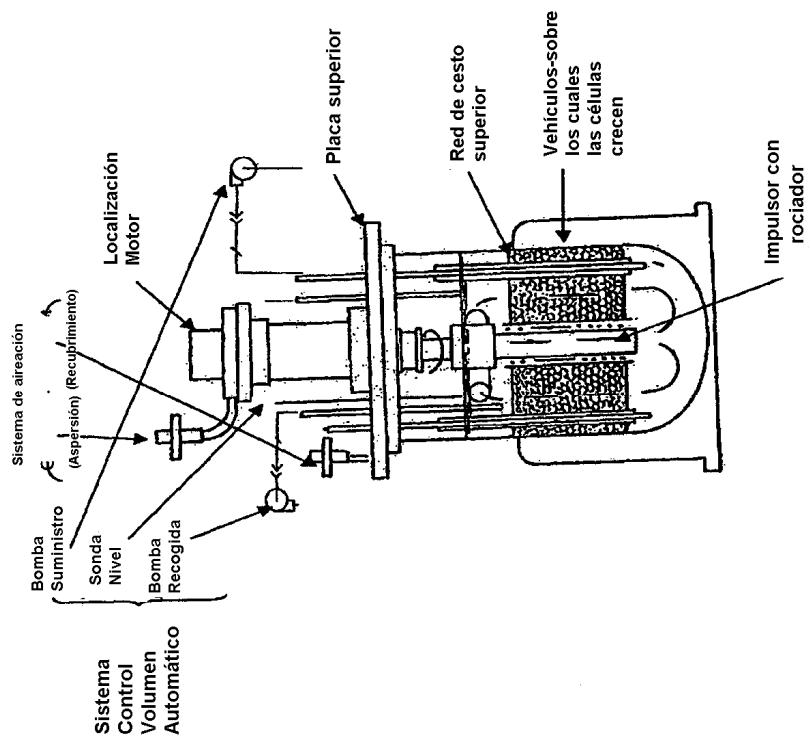
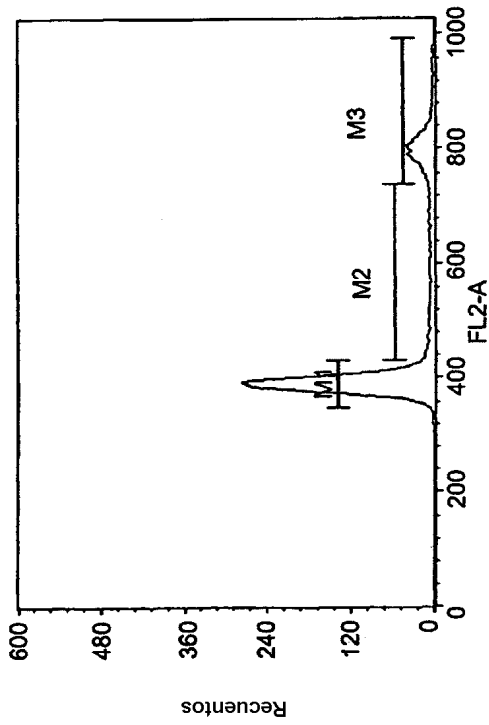


FIG. 8C



Estadísticas Histograma

Unidades de Datos Log.: Valores lineales

Muestra ID:

Nombre Paciente:

Entrada:G1

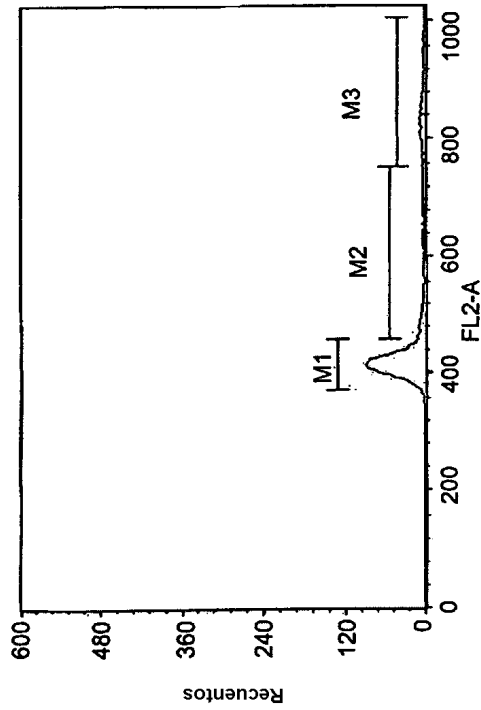
Eventos acotados: 13880

Parámetro X:FL2-A(Lineal)

Eventos Totales: 15750

Marcador	Izq.	Derec.	Eventos	% Acotado	% Total	Media	Geo Media	CV	Media	Ch. Pico
All	0	1023	13860	100.00	88.00	485.37	463.42	33.41	397.00	393
M1	347	430	9447	68.16	59.98	388.49	388.23	3.71	389.00	393
M2	430	738	1956	14.13	12.43	570.70	562.60	16.86	563.00	437
M3	738	991	2422	17.47	15.38	798.57	797.80	4.46	798.00	797

FIG. 9A



Estadísticas Histograma
 Unidades Datos Log.: Valores Lineales:
 Muestra ID: ID Paciente:
 Nombre Paciente: Número Caso:
 Eventos Acotados: 5202 Entrada: G1
 Parámetro X: FL2-A(Lineal) Eventos Totales : 15420

Marca	Izq.	Derec.	Eventos	Acotado	% Total	Media	Media Geo	CV	Media	Ch Pico
All	0	1023	5202	100.00	33.74	474.23	458.74	29.62	419.00	413
M1	370	457	3944	76.82	25.68	413.33	412.96	4.24	413.00	413
M2	457	752	597	11.48	3.87	538.87	531.96	16.91	494.00	464
M3	752	1005	591	11.36	3.83	833.73	832.39	5.75	827.00	829

FIG. 9B

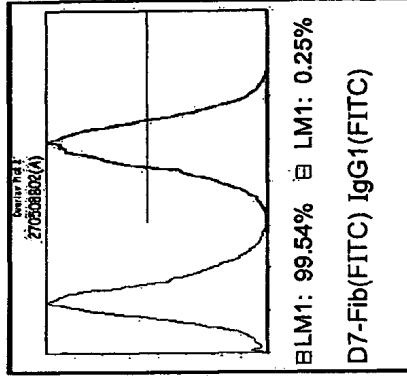


FIG. 10C

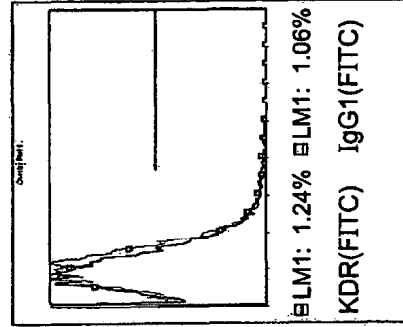


FIG. 10B

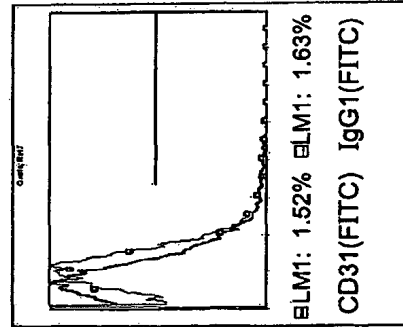


FIG. 10A

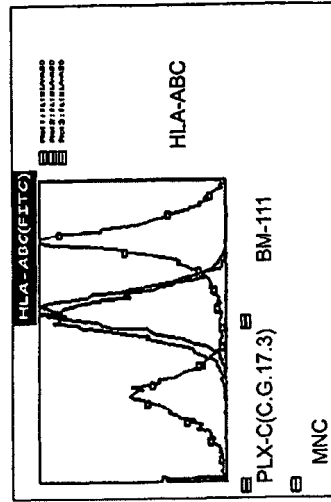
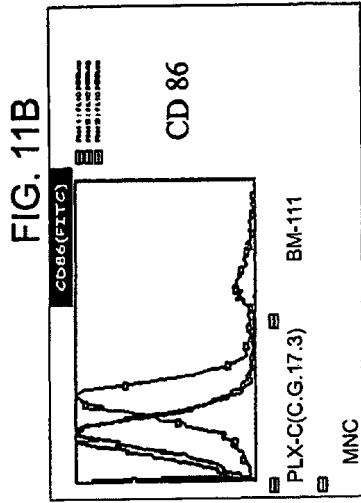


FIG. 11D

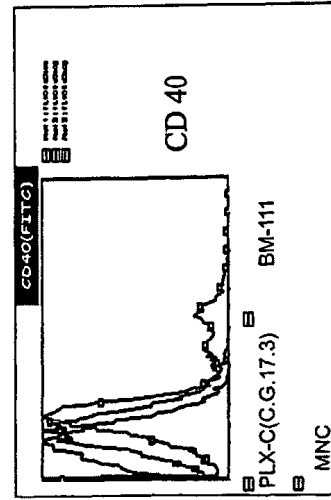
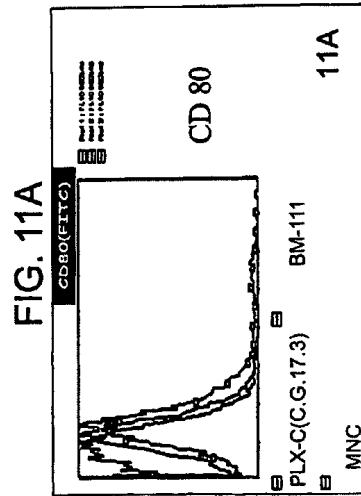
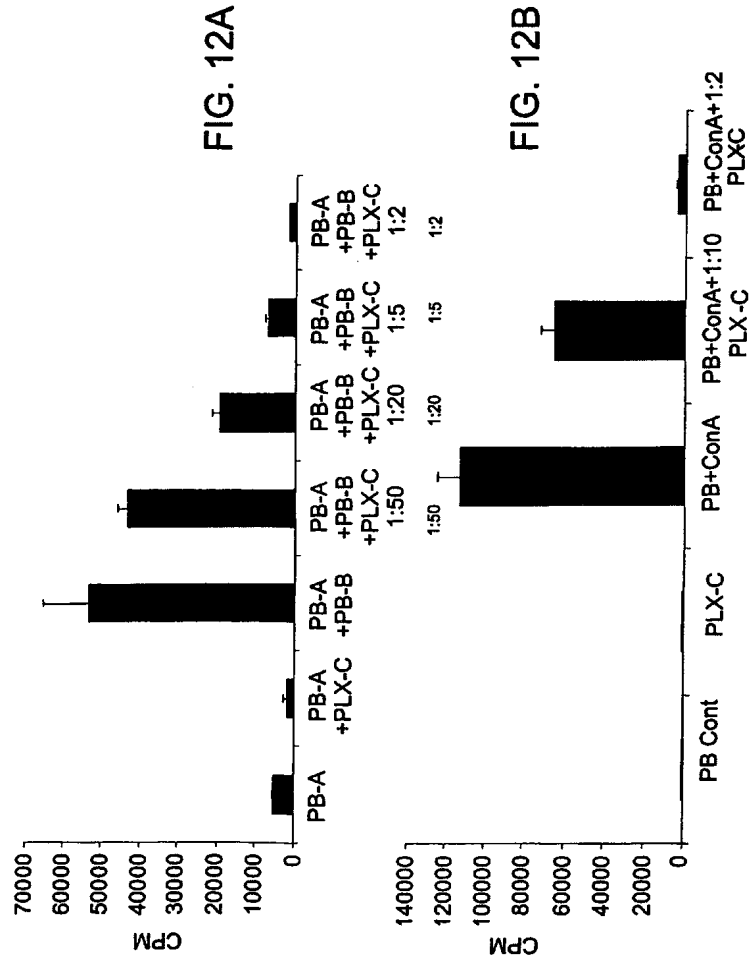
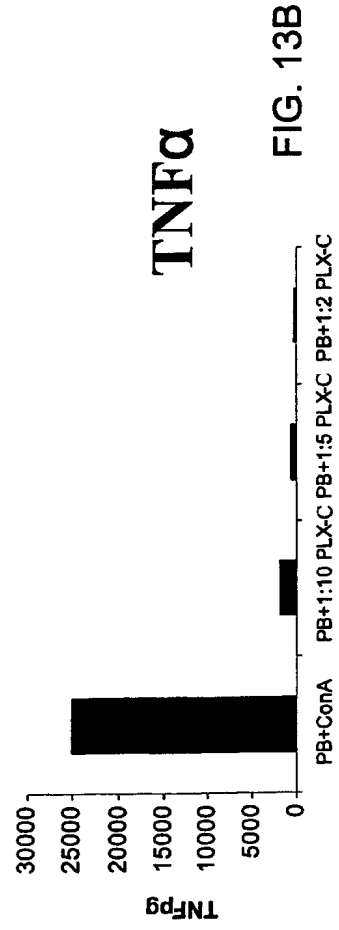
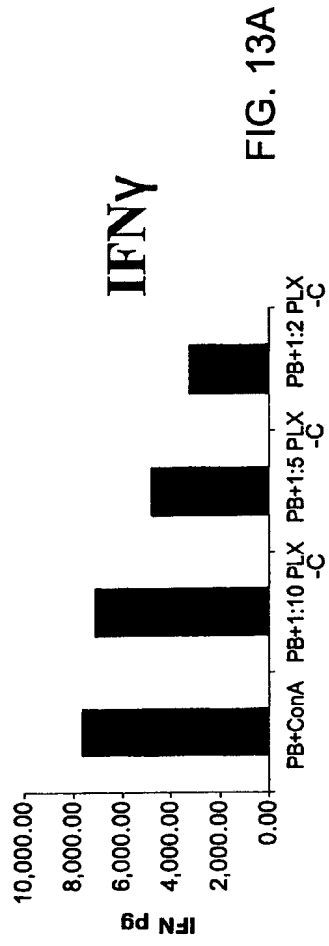


FIG. 11C





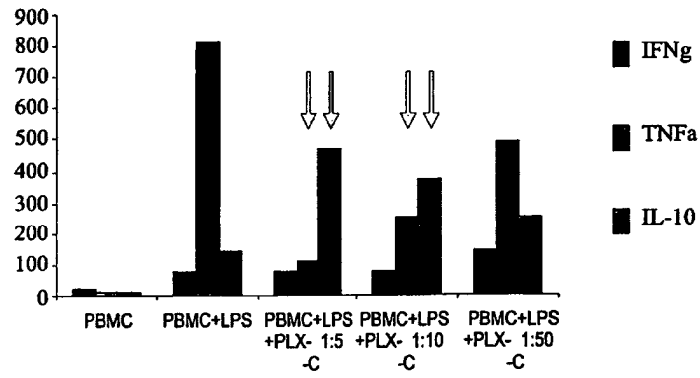


FIG. 13C

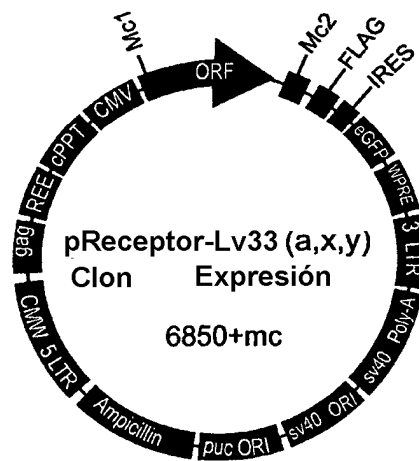


FIG. 14

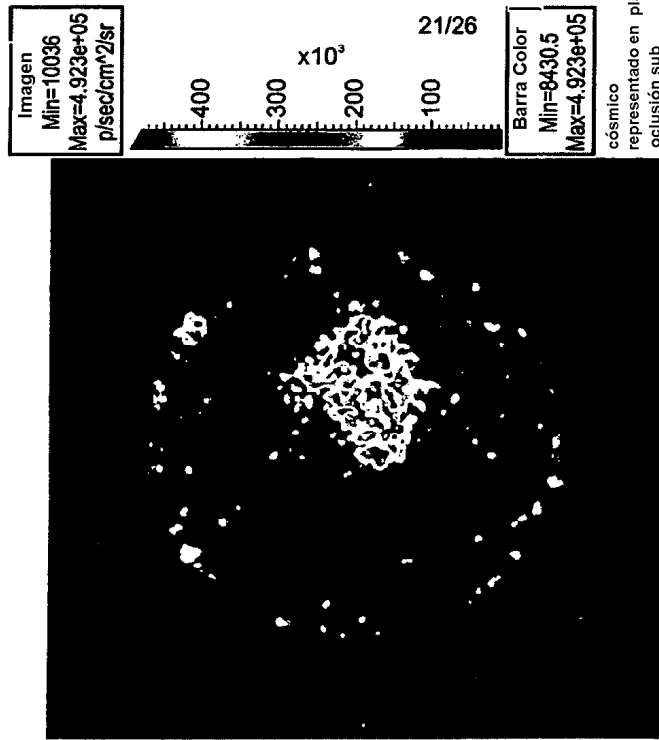


FIG. 15

Serie:
Experimento PLC28PL
Etiqueta: Infección lentivirus
Comentario Foto 1

Filtro Em=Abierto
Bin:1(8),FOV13,f1,1m
Cámara:IVIS 23324, Instrumentos Espectrales TE

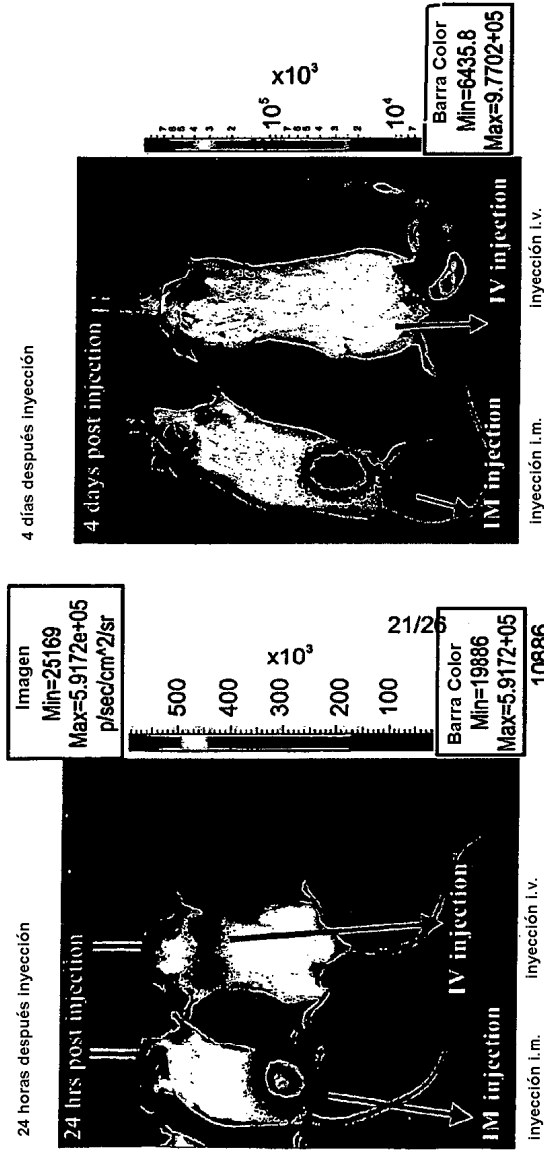


FIG. 16B

FIG. 16A

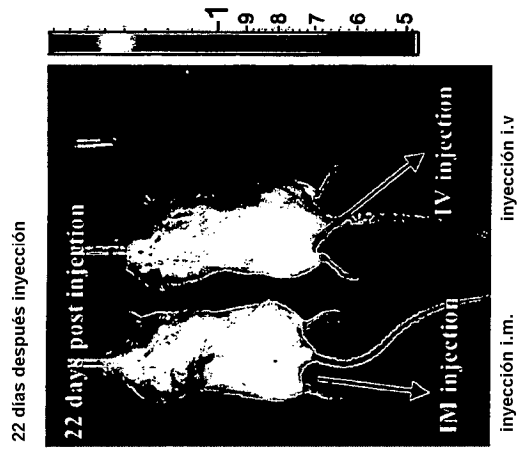


FIG. 16D

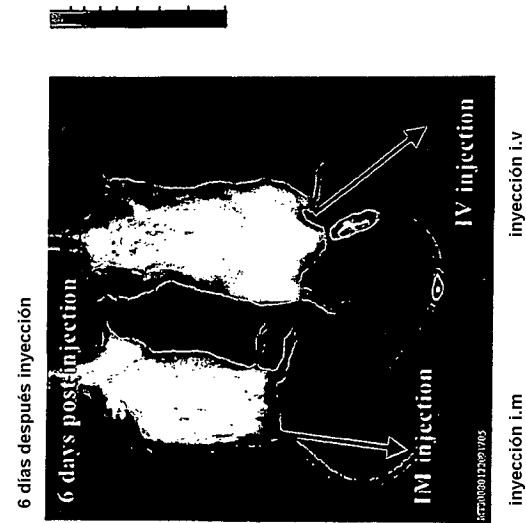
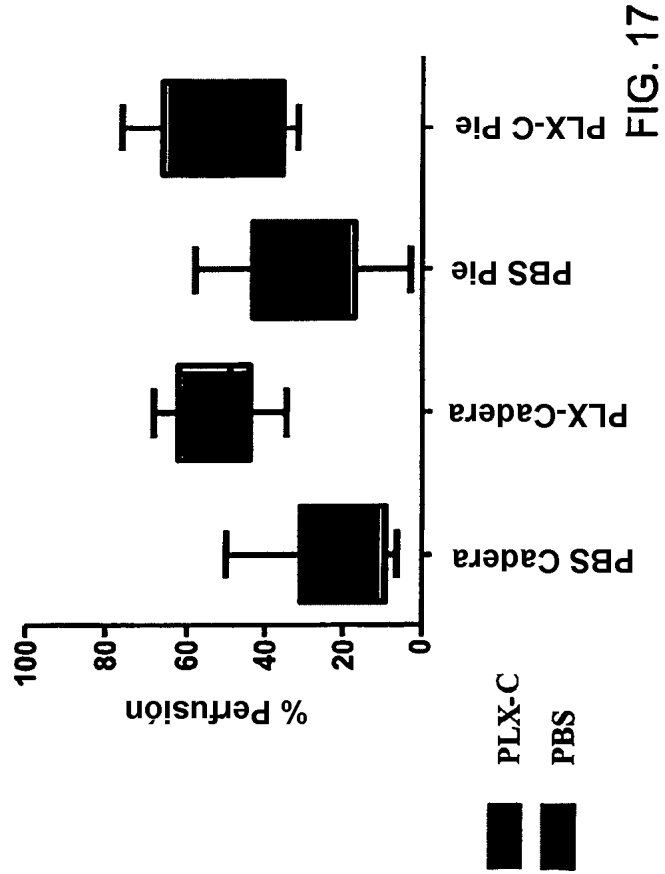


FIG. 16C



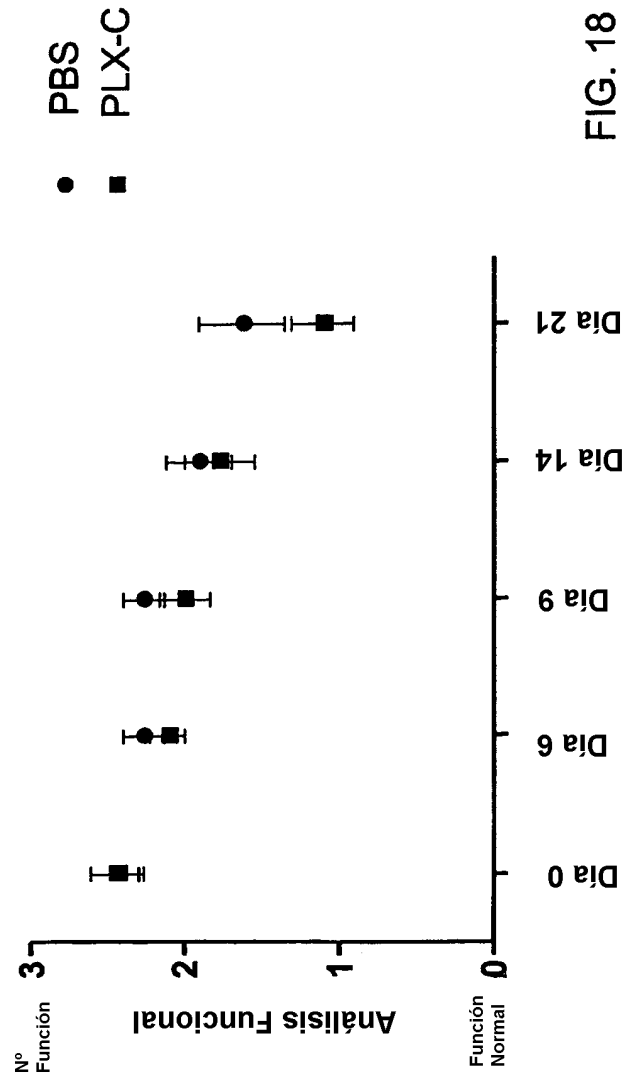


FIG. 18

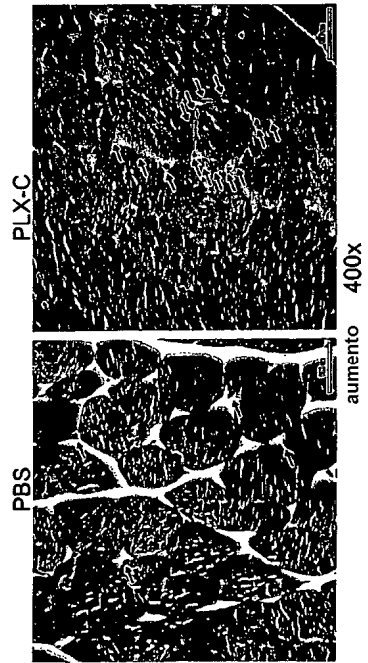


FIG. 19A

FIG. 19B

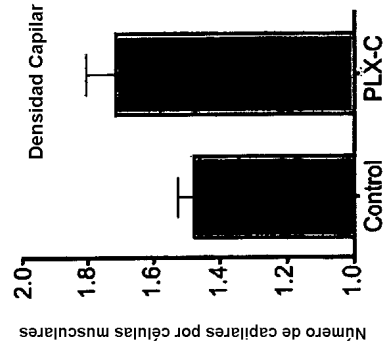


FIG. 19C

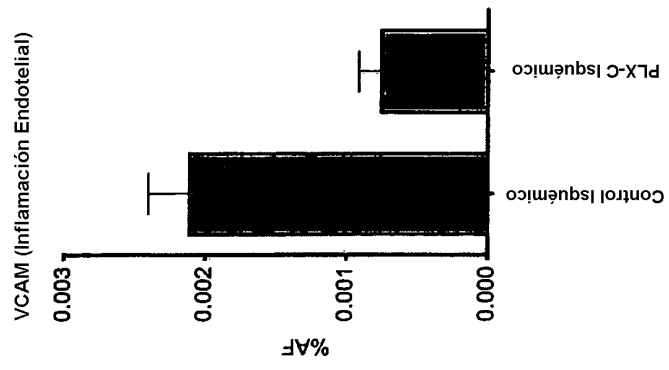


FIG. 20B

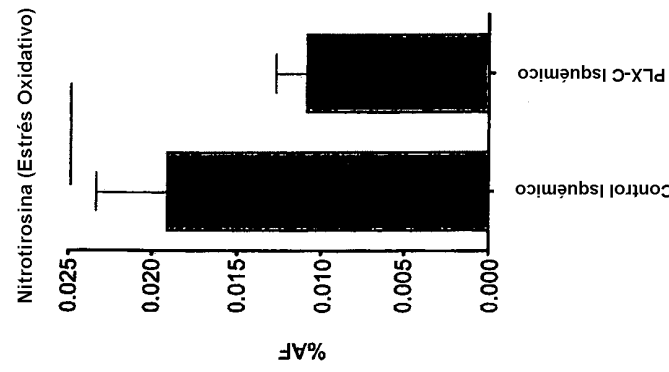


FIG. 20A