

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 556**

51 Int. Cl.:

A61K 35/50 (2015.01)

C12N 5/073 (2010.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2009 E 13162390 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2633861**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de defectos óseos con poblaciones de células placentarias**

30 Prioridad:

22.08.2008 US 90897 P

22.08.2008 US 90898 P

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

30.11.2015

73 Titular/es:

**ANTHROGENESIS CORPORATION (100.0%)
7 Powder Horn Drive
Warren, NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**ABRAMSON, SASCHA DAWN;
GUELAKIS, MARIAN;
HEIDARAN, MOHAMMAD A.;
LABAZZO, KRISTEN y
YACCOBY, SHMUEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 552 556 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para el tratamiento de defectos óseos con poblaciones de células placentarias

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 61/090.898, presentada el 22 de agosto de 2008, y de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 61/090.897, presentada el 22 de agosto, 2008.

1. Campo

La invención se refiere en general a poblaciones aisladas de células placentarias adherentes osteogénicas (OPAC, por sus siglas en inglés) y a métodos de uso de OPAC, p.ej. en el tratamiento de mieloma múltiple, y disminución, detención o inversión de pérdida ósea asociada con o causada por mieloma múltiple.

2. Antecedentes

El mieloma múltiple (también conocido como MM, mieloma, mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler) es un tipo de cáncer de las células plasmáticas, que son células del sistema inmune que producen anticuerpos. Los síntomas del mieloma múltiple incluyen dolor óseo, infección, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas. La enfermedad es considerada incurable y sólo unos pocos tratamientos, tales como lenalidomida (REVLIMID®) están disponibles y parecen prometedores. En este sentido, existe una necesidad de nuevos tratamientos para el mieloma múltiple.

3. Compendio

La invención se refiere a células adherentes placentarias osteogénicas (OPAC) aisladas, poblaciones de OPAC y poblaciones de células que comprenden OPAC, en donde las OPAC están presentes en el corion y se aíslan del mismo. En ciertas realizaciones, las OPAC no están aisladas del contorno coriónico (liso). Las OPAC exhiben una o más características de las células madre o células multipotentes (por ejemplo, exhiben marcadores asociados con las células madre o células multipotentes, se replican al menos 10-20 veces en cultivo en un estado no diferenciado, se diferencian en células adultas representativas de al menos una de las tres capas germinales, etc.) y pueden adherirse a un sustrato para cultivo tisular (por ejemplo, plástico para cultivo tisular tal como la superficie de un plato o placa de múltiples pocillos para cultivo tisular). Concretamente, la invención proporciona métodos de uso de OPAC en el tratamiento de defectos óseos, y en el tratamiento de cáncer relacionado con los huesos, p.ej., mieloma múltiple, y métodos de uso de las OPAC para reducir, detener o revertir la pérdida ósea asociada con mieloma múltiple o causada por el mismo.

Una OPAC aislada para uso de acuerdo con la invención es una célula adherente placentaria osteogénica aislada que es adherente a plástico para cultivo tisular, osteogénica y aislada del corion, excluyendo el contorno coriónico (liso). Las OPAC no son trofoblastos, citotrofoblastos, células madre embrionarias ni células germinales embrionarias, ya que esas células son conocidas y se entienden en la técnica.

De acuerdo con la invención, una OPAC es una célula CD200⁻ o CD200^{tenue} aislada, por ejemplo, una que está aislada del corion, pero no del contorno coriónico (liso). Además, la OPAC es positiva para CD105. En una realización específica, una OPAC es osteogénica. En una realización específica, una OPAC es positiva para la secreción de osteoprotegerina (OPG), por ejemplo, según se detecta por citometría de flujo. La osteoprotegerina es un receptor señuelo secretado por osteoblastos que se une específicamente al factor de diferenciación de osteoclastos (ODF) e inhibe la maduración de osteoclastos. Por lo tanto, las OPAC promueven la formación ósea y reducen la pérdida ósea mediada por osteoclastos. En otra realización específica, una OPAC no expresa RANKL (Receptor activador del ligando del factor nuclear κ B; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank AAB86811.1), por ejemplo, según se detecta por RT-PCR cuantitativa. RANKL es una proteína que activa osteoclastos, que participan en la resorción ósea. Por lo tanto, las OPAC no promueven la resorción ósea. Así, de acuerdo con la invención, una OPAC es CD200⁻ o CD200^{tenue} y CD105⁺. En otra realización específica, una OPAC es negativa para la expresión de α -actina de músculo liso (ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NP_001604), negativa para RANKL o positiva para la expresión de NG2 (proteoglicano de sulfato de condroitina de célula neuroglial 2), por ejemplo, según se determina por la tinción de anticuerpos. En ciertas realizaciones, la tinción para dicho NG2 en las OPAC es difusa, en comparación con células madre placentarias adherentes al plástico para cultivo tisular CD200⁺ (no tenue), en las cuales la tinción de NG2 está enfocada. En otra realización específica, una OPAC es negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para RANKL, positiva para la expresión de NG2 y positiva para la secreción de osteoprotegerina. En otra realización específica, una OPAC exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible, por ejemplo, según se determina por un ensayo colorimétrico. En una realización más específica, una OPAC es CD200⁻ o CD200^{tenue}, CD105⁺, según se detecta mediante citometría de flujo, y es negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible. En otra realización más específica, una OPAC es CD200⁻ o CD200^{tenue}, CD105⁺ y es negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina y exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible.

En otra realización específica, una OPAC es SSEA3⁺ o SSEA4⁺. En una realización más específica, una OPAC es SSEA3⁺ y SSEA4⁺. En otra realización más específica, una OPAC es CD200⁻, CD105⁺, SSEA3⁺ y también es negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible.

5 En otra realización más específica, una OPAC es CD200⁻, CD105⁺, SSEA4⁺ y también es negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible. En una realización más específica, una OPAC es CD200⁻, CD105⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺ y también es negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible.

En ciertas realizaciones, la OPAC, población de OPAC o población de células que comprenden las OPAC facilita la formación de una matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada.

15 La invención también se refiere a poblaciones de células que comprenden OPAC, en donde la población de células es CD200⁻ o CD200^{tenue}. Por ejemplo, una población aislada de células que comprenden OPAC no está aislada del contorno coriónico (liso) y es CD200⁻ o CD200^{tenue}. La población de células puede consistir esencialmente en OPAC y ser osteogénica. Dicha población de células puede ser CD200⁻ y CD105⁺ según se detecta por citometría de flujo, o CD200^{tenue} y CD105⁺ según se detecta por citometría de flujo. Dicha población de células puede ser negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, positiva para la expresión de NG2, o positiva para la secreción de osteoprotegerina. La tinción para dicho NG2 en las OPAC puede ser difusa, en comparación con células madre placentarias adherentes al plástico para cultivo tisular CD200⁺ (no tenue), en las cuales la tinción de NG2 está enfocada. Dicha población de células puede ser negativa para la expresión de RANKL, por ejemplo, según se detecta por RT-PCR cuantitativa. Dicha población de células puede ser negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, positiva para la expresión de NG2 y positiva para la secreción de osteoprotegerina. Dicha población de células puede exhibir actividad de fosfatasa alcalina inducible. Concretamente, dicha población puede ser CD200⁻, CD105⁺ o CD200^{tenue}, CD105⁺ y también ser una o más de negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibir actividad de fosfatasa alcalina inducible. Más específicamente, dicha población de células puede ser CD200⁻, CD105⁺ o CD200^{tenue}, CD105⁺; ser negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina y exhibir actividad de fosfatasa alcalina inducible.

Dicha población de células puede ser SSEA3⁺ o SSEA4⁺. Alternativamente, dicha población de células puede ser SSEA3⁺ y SSEA4⁺. Dicha población de células puede ser CD200⁻, CD105⁺ o CD200^{tenue}, CD105⁺, SSEA3⁺ y también negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibir actividad de fosfatasa alcalina inducible. Más específicamente, dicha población de células puede ser CD200⁻ o CD200^{tenue}, ser CD105⁺ y SSEA4⁺ y también ser negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibir actividad de fosfatasa alcalina inducible. Más específicamente, dicha población de células puede ser CD200⁻ o CD200^{tenue}, ser CD105⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina y/o exhibir actividad de fosfatasa alcalina inducible.

La población de células que comprende OPAC puede expresar una metalopeptidasa de la matriz 9 (MMP9) a un nivel notoriamente más alto en un medio osteogénico que un número equivalente de células madre placentarias adherentes CD200⁺, no tenues, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

La OPAC para uso de acuerdo con la invención puede expresar uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias adherentes CD200⁺, no tenues, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP3 (proteína morfogenética ósea 3), CDH11 (cadherina tipo II), COL10A1 (colágeno tipo X, alfa 1), COL14A1 (colágeno, tipo XIV, alfa 1), COL15A1 (colágeno, tipo XV, alfa 1), DMP1 (fosfoproteína ácida de la matriz de la dentina 1), DSPP (sialofosfoproteína de la dentina), ENAM (enamelina), FGFR2 (receptor del factor 2 de crecimiento de fibroblastos), MMP10 (metaloproteasa de la matriz 10 (estromelina 2)), TGFB3 (factor de transformación de crecimiento, β 3) y/o TGFB1 (factor de transformación de crecimiento β , receptor 1) cuando una OPAC y dicha célula madre placentaria CD200⁺ se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

En otra realización específica, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias adherentes CD200⁺, no tenues, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AMBN (ameloblastina (proteína de la matriz del esmalte)), BMP2 (proteína morfogenética ósea 2), CALCR (receptor de calcitonina), CDH11, COL11A1 (colágeno, tipo XI, alfa 1), COL14A1, COL15A1, COL2A1 (colágeno, tipo II, alfa 1), CSF2 (factor 2 de estimulación de colonias (granulocito-macrófago)), CSF3 (factor 3 de estimulación de colonias (granulocito)), DMP1, DSPP, ENAM, FGF3 (factor 3 de crecimiento de fibroblastos), GDF10 (factor 10 de diferenciación de crecimiento), IGF1 (factor 1 de crecimiento similar a la insulina),

5 ITGA1 (integrina, alfa 1 (CD49)), ITGA2 (integrina, alfa 2 (CD49B)), MMP8 (metaloproteasa de la matriz 8 (colagenasa de neutrófilos)), MMP9 (metalopectidasa de la matriz 9 (gelatinasa B, gelatinasa de 92 kDa, colagenasa tipo IV de 92 kDa)), MMP10, PDGFA (factor de crecimiento A derivado de plaquetas), SMAD1 (miembro de la familia SMAD 1), TGFB3, TGFBR1 y/o TGFBR2 (factor de transformación de crecimiento beta, receptor 2) cuando las OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

10 En otra realización específica, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de CDH11, COL14A1, COL15A1, DMP1, DSPP, ENAM, MMP10, TGFB3 y/o TGFBR1, independientemente de si las OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

15 En otra realización específica, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AHSG (glicoproteína alfa-2-HS), ALPL (fosfatasa alcalina de hígado/hueso/riñón), EGF (factor de crecimiento epidérmico), FLT1 (tirosina quinasa 1 relacionada con fms (factor de crecimiento endotelial vascular/receptor del factor de permeabilidad vascular)), IGF2, ITGA2, ITGAM (integrina, alfa M (subunidad 3 del receptor del componente 3 del complemento)), SCARB1 (receptor depurador clase B, miembro 1), SOX9 (SRY (región de determinación sexual Y)-caja 9), TNF (factor de necrosis tumoral), TWIST1 (homólogo 1 de Twist; anteriormente blefarofimosis, epicanto inverso y ptosis 3, acrocefalosindactilia 3), VCAM1 (molécula 1 de adhesión celular vascular 1) y/o VDR (receptor de vitamina D (1,25-dihidroxitamina D3)) cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

25 En otra realización específica, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre placentarias, CD200⁺, no tenues, adherentes, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BGN (biglicano), COL11A1, COMP (proteína oligomérica de la matriz del cartílago) FGF1 y/o VCAM1 cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

30 En otra realización específica, las OPAC expresan VCAM1 a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

35 En otra realización específica, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP4, CALCR, CD36, CDH11, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL3A1, COL5A1, DMP1, DSPP, FLT1, MSX1, PDGFA, TGFB3, TGFBR1 y/o TUFT1 (Tuftelina 1), cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

40 En otra realización específica, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AMBN, CALCR, COL14A1, COL15A1, CSF3, DMP1, DSPP, ITGA1, ITGA2, MMP10, MMP9, MSX1, PDGFA, TGFB1, TGFB3, TGFBR1 y/o TGFBR2, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

45 En otra realización específica, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de CALCR, COL14A1; COL15A1, DMP1, DSPP, MSX1, PDGFA, TGFB3 y/o TGFBR1, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

50 En otra realización específica, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de ALPL, BGLAP (proteína (gla) ósea gamma-carboxiglutamato), IGF2, ITGA2, ITGAM, SCARB1 y/o SOX1, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

55 En otra realización específica, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AHSG, ALPL, BGLAP, BGN, BMP3, BMP5, CD36, COL10A1, COL11A1, COL12A1, COL2A1, COL4A3, COMP, EGF, FGF1, FGFR2, IGF2, MMP8, PHEX (homólogo de la endopeptidasa reguladora de fosfato, ligada a X), RUNX2 (factor de transcripción 2 relacionado con Runt), SCARB1, SOX1, VCAM1

y/o VEGFB, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

5 En otra realización específica, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de ALPL, BGLAP, IGF2, SCARB1 y/o SOX9, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En una realización más específica de cada una de las realizaciones anteriores, las OPAC y dichas células madre placentarias CD200⁺ o células madre mesenquimales se han sometido a un número equivalente de pases o duplicaciones celulares.

10 En otra realización, un gen que codifica metalopeptidasa de la matriz 9 (MMP9) se induce en dichas OPAC en un medio osteogénico, en comparación con la expresión de MMP9 en un medio de crecimiento, al menos 2, 3, 4 o 5 órdenes de magnitud más que lo que dicha MMP9 se induce en células madre placentarias, por ejemplo, células placentarias multipotentes adherentes al cultivo tisular CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, en dicho medio osteogénico, en comparación con la expresión de MMP9 en dicho medio de crecimiento, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En otra realización, un gen que codifica metalopeptidasa de la matriz 9 (MMP9) se induce en dichas OPAC en un medio osteogénico, en comparación con la expresión de MMP9 en un medio de crecimiento, al menos 2, 3, 4 o 5 órdenes de magnitud más que lo que dicha MMP9 se induce en células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea en dicho medio osteogénico, en comparación con la expresión de MMP9 en dicho medio de crecimiento, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En otra realización, un gen que codifica metalopeptidasa de la matriz 9 (MMP9) se induce en dichas OPAC en un medio osteogénico, en comparación con la expresión de MMP9 en un medio de crecimiento, al menos 2, 3, 4 o 5 órdenes de magnitud más que lo que dicha MMP9 se induce en fibroblastos en dicho medio osteogénico, en comparación con la expresión de MMP9 en dicho medio de crecimiento, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

25 Al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células en una población de células que comprenden OPAC pueden ser CD200⁻ y/o CD200^{tenue}. Alternativamente, al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las OPAC en una población de células que comprenden OPAC son CD200⁻ y/o CD200^{tenue}.

30 Una población aislada de OPAC puede producirse aislando el tejido coriónico de una placenta, en donde dicho tejido coriónico no es un tejido del contorno coriónico (liso); digiriendo el tejido coriónico aislado con una enzima que altera el tejido para obtener una población de células coriónicas que comprenden OPAC; y aislando dichas OPAC de dichas células coriónicas. La enzima que altera el tejido puede ser tripsina, dispasa o colagenasa. Las OPAC, contenidas dentro de una población de células obtenidas de digerir tejido coriónico, pueden ser al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% de dicha población de células coriónicas.

35 Las OPAC, y poblaciones de células que comprenden OPAC, incluyen OPAC y poblaciones de células que contienen OPAC que han sido cultivadas, por ejemplo, para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más pases o para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 duplicaciones de poblaciones. Las poblaciones de OPAC también incluyen poblaciones de, por ejemplo, dos o más, OPAC en cultivo y una población en un recipiente, por ejemplo, una bolsa.

40 En la presente memoria también se divulga un método para producir células osteogénicas con la capacidad de mineralizar una matriz que comprende cultivar una pluralidad de OPAC o una población de OPAC aisladas, en condiciones en las cuales dichas OPAC se diferencian en células osteogénicas, llevándose a cabo dicho cultivo por un tiempo suficiente para que dichas células osteogénicas produzcan o faciliten la producción de cantidades detectables de matriz mineralizada que comprende calcio y/o fosfato. De acuerdo con la invención, las OPAC producen o facilitan la producción de hueso.

45 Las OPAC para uso de acuerdo con la invención se pueden formular como una composición, por ejemplo, una composición implantable. En una realización específica, la composición implantable comprende una matriz. En una realización más específica, dicha matriz es un andamio tridimensional. En otra realización más específica, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, oritina o vitronectina. En otra realización más específica, la matriz es una membrana amniótica o un biomaterial derivado de una membrana amniótica. En otra realización más específica, dicha matriz comprende una proteína de membrana extracelular. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto sintético. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otra realización más específica, dicho compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, citoquina, anticuerpo o molécula orgánica de menos de 5.000 daltones. En algunas realizaciones, la matriz es un polímero degradable sintético tal como, por ejemplo, ácido poliláctico o ácido poliglicólico. En algunas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de β -fosfato tricálcico, un sustrato de β -fosfato-colágeno tricálcico, un sustrato de colágeno, un sustrato de fosfato de calcio, un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado, un sustrato de ácido hialurónico o un sustrato cerámico. En algunas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de β -fosfato tricálcico. En algunas realizaciones, el sustrato de andamio

implantable es un sustrato de β -fosfato-colágeno tricálcico. En algunas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de colágeno. En algunas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de fosfato de calcio. En algunas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado.

5 De acuerdo con la invención, tratar defectos óseos en un sujeto comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición inyectable o implantable que comprende una población de OPAC definidas en la presente anteriormente, tratando así el defecto óseo en el sujeto. En ciertas realizaciones, el defecto óseo es una lesión osteolítica asociada con un cáncer, una fractura ósea o una columna vertebral, por ejemplo, que necesita fusión. En ciertas realizaciones, la lesión osteolítica está asociada con mieloma múltiple, cáncer óseo o cáncer metastásico. En
10 ciertas realizaciones, la fractura ósea es una fractura no consolidada. En ciertas realizaciones, una composición implantable se implanta quirúrgicamente, por ejemplo, en el sitio del defecto óseo. En ciertas realizaciones, una composición inyectable se administra quirúrgicamente a la región del defecto óseo. En ciertas realizaciones, la composición inyectable se administra sistémicamente.

15 Además en la presente se describe un método para producir células osteogénicas que comprenden cultivar una pluralidad de OPAC o una población de OPAC aisladas en condiciones en las cuales dichas OPAC se diferencian en células osteogénicas, llevándose a cabo dicho cultivo por un tiempo suficiente para que dichas células osteogénicas produzcan o faciliten la producción de cantidades detectables de calcio mineralizado, tejido óseo o hueso.

Una composición inyectable puede formularse combinando una población de OPAC con ácido hialurónico o colágeno inyectable. La composición puede comprender ácido hialurónico inyectable o colágeno inyectable.

20 Además, en la presente se divulgan métodos para tratar individuos que tienen un cáncer relacionado con los huesos, por ejemplo, mieloma múltiple, cáncer óseo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, cordoma, histiocitoma maligno fibroso óseo, fibrosarcoma óseo, cáncer metastásico, mieloma múltiple y cualquier forma de cáncer metastásico caracterizado por metástasis óseas. Un método de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer relacionado con los huesos comprende administrar a
25 dicho individuo OPAC aisladas, por ejemplo, una población aislada de células que comprende OPAC, en donde dichas OPAC se obtienen del corion y son adherentes al plástico para cultivo tisular y en donde dichas OPAC son negativas para CD200 o son CD200^{tenue} y positivas para CD105 y donde dicha administración reduce notoriamente el avance, detiene el avance o mejora uno o más síntomas de dicho mieloma múltiple. Dichas OPAC pueden ser SSEA3⁺ o SSEA4⁺. Dichas OPAC pueden ser SSEA3⁺ y SSEA4⁺. Las OPAC pueden ser CD200⁻, CD105⁺, SSEA3⁺
30 y también ser negativas para la expresión de α -actina de músculo liso, negativas para la expresión de RANKL, positivas para la expresión de NG2, positivas para la expresión de osteoprotegerina o exhiben actividad de fosfatasa alcalina inducible. Más específicamente, las OPAC pueden ser CD200⁻ y/o CD200^{tenue}, CD105⁺, SSEA4⁺ y también ser negativas para la expresión de α -actina de músculo liso, negativas para RANKL, positivas para la expresión de NG2, positivas para la expresión de osteoprotegerina o exhiben actividad de fosfatasa alcalina inducible. Más específicamente, las OPAC son CD200⁻ y/o CD200^{tenue}, CD105⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺ y también son negativas para la
35 expresión de α -actina de músculo liso, negativas para RANKL, positivas para la expresión de NG2, positivas para la expresión de osteoprotegerina o exhiben actividad de fosfatasa alcalina inducible. En otras realizaciones específicas, las OPAC comprenden cualquiera de las características o combinaciones de características enumeradas en la Sección 5.1, más adelante.

40 En otra realización específica de la presente invención, dichas OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias adherentes, CD200⁺, no tenues, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP3, CDH11, COL10A1, COL14A1, COL15A1, DMP1, DSPP, ENAM, FGFR2, MMP10, TGFB3 y/o TGFB1, cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias CD200⁺ se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR
45 cuantitativa en tiempo real.

Dichas OPAC para uso en los métodos de tratamiento expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AMBN, BMP2, CALCR, CDH11, COL11A1, COL14A1, COL15A1, COL2A1, CSF2, CSF3, DMP1, DSPP, ENAM, FGF3, GDF10, IGF1, ITGA1, ITGA2, MMP10, MMP8, MMP9, PDGFA, SMAD1, TGFB3, TGFB1 y/o TGFB2, cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un
50 medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

Por ejemplo, dichas OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de CDH11, COL14A1, COL15A1, DMP1, DSPP, ENAM, MMP10, TGFB3 y/o TGFB1, independientemente
55 de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

Alternativamente, dichas OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AHSG, ALPL, EGF, FLT1, IGF2, ITGA2, ITGAM, SCARB1, SOX9, TNF, TWIST1,

VCAM1 o VDR cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

5 Dichas OPAC pueden expresar uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre placentarias, CD200⁺, no tenues, adherentes, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BGN, COL11A1, COMP, FGF1 y/o VCAM1 cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

10 Dichas OPAC pueden expresar VCAM1 a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

15 Dichas OPAC pueden expresar uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP4, CALCR, CD36, CDH11, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL3A1, COL5A1, DMP1, DSPP, FLT1, MSX1, PDGFA, TGFB3, TGFBR1 y/o TUFT1, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

20 Dichas OPAC pueden expresar uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AMBN, CALCR, COL14A1, COL15A1, CSF3, DMP1, DSPP, ITGA1, ITGA2, MMP10, MMP9, MSX1, PDGFA, TGFB1, TGFB3, TGFBR1 y/o TGFBR2, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

25 Dichas OPAC pueden expresar uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de CALCR, COL14A1, COL15A1, DMP1, DSPP, MSX1, PDGFA, TGFB3 y/o TGFBR1, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

30 Dichas OPAC pueden expresar uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de ALPL, BGLAP (proteína (gla) ósea gamma-carboxiglutamato), IGF2, ITGA2, ITGAM, SCARB1 y/o SOX1, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

35 Dichas OPAC pueden expresar uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AHSG, ALPL, BGLAP, BGN, BMP3, BMP5, CD36, COL10A1, COL11A1, COL12A1, COL2A1, COL4A3, COMP, EGF, FGF1, FGFR2, IGF2, MMP8, PHEX, RUNX2, SCARB1, SOX1, VCAM1 y/o VEGFB, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

40 Dichas OPAC pueden expresar uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de ALPL, BGLAP, IGF2, SCARB1 y/o SOX9, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

45 Lo que se utiliza para tratar mieloma múltiple, dichas OPAC: expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de BMP4, BMP6, CD36, CDH11, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL3A1, COL5A1, CSF2, CTSK, FGF2, FGFR1, FLT1, ITGA1, MINPP1, MMP9, MSX1, PDGFA, SERPINH1, TGFB3 y TGFBR1, en donde dichas OPAC y dichas células madre mesenquimales se han sometido a un número equivalente de pases o duplicaciones celulares; o expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células de fibroblastos, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de BMP4, BMP6, CDH11, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL3A1, COL5A1, FLT1, IGF1R, ITGA1, MINPP1, PDGFA, SERPINH1, SMAD3, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TNF, TUFT1, VCAM1 y VEGFA y en donde dichas células de fibroblastos se han sometido a un número equivalente de pases o duplicaciones celulares.

55 Dichas OPAC para tratar mieloma múltiple secretan una o más de las proteínas decorina, epirregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, proteína de unión a TGF-beta latente 1 (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 o TIMP-2. Más específicamente, dichas OPAC secretan las proteínas decorina, epirregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, proteína de unión a TGF-beta latente 1 (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 y TIMP-2.

Los síntomas del mieloma múltiple son dolor óseo, lesiones osteocíticas (por ejemplo, visibles mediante rayos X o imagen de resonancia magnética (MRI)), osteoporosis, anemia, hipercalcemia o un síntoma debido a hipercalcemia o insuficiencia renal. La administración de OPAC provoca un aumento detectable o una disminución de la reducción de la densidad mineral ósea o contenido mineral óseo en dicho individuo. Al menos 1×10^8 OPAC/kg se puede administrar a un individuo, donde dicho individuo nunca ha sido tratado por mieloma múltiple; dicho individuo ha sido tratado por mieloma múltiple y responde a una terapia sin OPAC; dicho individuo ha sido tratado por mieloma múltiple y no ha respondido a una terapia sin OPAC, pero el mieloma múltiple en dicho individuo no ha progresado; o dicho individuo tiene mieloma múltiple progresivo.

Un método para tratar defectos óseos en un sujeto comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición inyectable o implantable que comprende una población de OPAC, tratando así el defecto óseo en el sujeto. En ciertas realizaciones, el defecto óseo es (a) una lesión osteolítica asociada con un cáncer, (b) una fractura ósea, (c) una columna vertebral que necesita fusión, (d) una fractura no consolidada o (e) osteoporosis. En ciertas realizaciones, la lesión osteolítica está asociada con mieloma múltiple, cáncer óseo o cáncer metastásico. En ciertas realizaciones, la fractura ósea es una fractura no consolidada. En ciertas realizaciones, se administra una composición implantable que comprende una población de OPAC a un sujeto. En ciertas realizaciones, la composición implantable se implanta quirúrgicamente. En ciertas realizaciones, se administra una composición inyectable que comprende una población de OPAC a un sujeto. En ciertas realizaciones, la composición inyectable se administra quirúrgicamente a la región del defecto óseo. En ciertas realizaciones, la composición inyectable se administra sistémicamente.

Un método para tratar defectos óseos en un sujeto comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición inyectable o implantable que comprende una población de OPAC, en donde dichas OPAC provocan o facilitan la formación de hueso o tejido óseo en el sujeto, tratando así el defecto óseo en el sujeto. En ciertas realizaciones, el defecto óseo es (a) una lesión osteolítica asociada con un cáncer, (b) una fractura ósea, (c) una columna vertebral que necesita fusión, (d) una fractura no consolidada o (e) osteoporosis. En ciertas realizaciones, la lesión osteolítica está asociada con mieloma múltiple, cáncer óseo o cáncer metastásico. En ciertas realizaciones, la fractura ósea es una fractura no consolidada. En ciertas realizaciones, se administra una composición implantable que comprende una población de OPAC a un sujeto. En ciertas realizaciones, la composición implantable se implanta quirúrgicamente. En ciertas realizaciones, se administra una composición inyectable que comprende una población de OPAC a un sujeto. En ciertas realizaciones, la composición inyectable se administra quirúrgicamente a la región del defecto óseo. En ciertas realizaciones, la composición inyectable se administra sistémicamente.

3.1 Definiciones

Tal como se utiliza en la presente, "que consiste esencialmente en", en el contexto de una población de células que comprenden OPAC, significa que la población de células es, por ejemplo, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 95% o al menos 95,5% OPAC.

Tal como se utiliza en la presente, los términos "OPAC" y "las OPAC" se refieren a las células descritas en la Sección 5.1, más adelante.

Tal como se utiliza en la presente, "CD200^{tenue}", cuando se refiere a una célula, significa que la célula exhibe intensidad de fluorescencia para CD200 en citometría de flujo que no es mayor que 20-30% sobre el testigo de isotipo. Tal como se utiliza en la presente, una población de células es CD200^{tenue} si al menos 60% de las células en la población no expresan CD200 o son CD200^{tenue} y la población de células, en su totalidad, en un ensayo citométrico de flujo, exhibe una intensidad de fluorescencia de CD200 que no es mayor que 40-60% sobre el testigo de isotipo. Cabe señalar que una población CD200^{tenue} puede comprender células CD200⁺ (no tenues).

Tal como se utiliza en la presente, el término "SH2" se refiere a un anticuerpo que se une a un epítipo en el marcador CD105. Por lo tanto, las células denominadas SH2⁺ son CD105⁺.

Tal como se utiliza en la presente, los términos "SH3" y "SH4" se refieren a anticuerpos que se unen a epítopos presentes en el marcador CD73. Por lo tanto, las células denominadas SH3⁺ y/o SH4⁺ son CD73⁺.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "OPAC aislada" significa una OPAC que está básicamente separada de otra no OPAC del tejido, por ejemplo, corion, del cual se derivan las OPAC. Una OPAC está "aislada" si al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o al menos 99% de las no OPAC con las cuales las OPAC están naturalmente asociadas se retiran de las OPAC, por ejemplo, durante la recolección y/o cultivo de las OPAC.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "población de células aisladas" significa una población de células que está básicamente separada de otras células del tejido, por ejemplo, placenta, de la cual se deriva la población de células. Una población de OPAC está "aislada" si al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o al menos 99% de las células con las cuales la población de OPAC, o células de las cuales la población de OPAC se deriva, está asociada naturalmente se retiran de la población de OPAC, por ejemplo, durante la recolección y/o cultivo.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "célula madre placentaria" se refiere a una célula madre o célula progenitora que se deriva de una placenta de mamífero, independientemente de la morfología, marcadores de superficie celular o el número de pases después de un cultivo primario. Sin embargo, la expresión "célula madre placentaria", tal como se utiliza en la presente, no se refiere a trofoblastos. Una célula es considerada una "célula madre" si la célula retiene al menos un atributo de una célula madre, por ejemplo, un perfil de marcador o expresión génica asociado con uno o más tipos de células madre; la capacidad de replicarse al menos 10-40 veces en cultivo, la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales; la falta de características de células adultas (es decir, diferenciadas) o similares. Las expresiones "célula madre placentaria" y "célula madre derivada de placenta" pueden utilizarse de forma intercambiable.

Tal como se utiliza en la presente, una célula es "positiva" para un marcador particular cuando el marcador es detectable. Por ejemplo, una OPAC es positiva para, por ejemplo, CD105 debido a que CD105 es detectable en células madre placentarias en una cantidad notoriamente mayor que el antecedente (en comparación con, por ejemplo, un testigo de isotipo). Una célula también es positiva para un marcador cuando ese marcador puede utilizarse para distinguir la célula de al menos otro tipo de célula o puede utilizarse para seleccionar o aislar la célula cuando esté presente o expresada por la célula, de manera similar, una población de células es positiva para un marcador cuando, por ejemplo, al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de las células en la población expresan el marcador.

Tal como se utiliza en la presente, una "célula osteogénica" es una célula que es capaz de depositar hidroxiapatita, el componente principal del hueso, o diferenciarse en una célula que es capaz de depositar hidroxiapatita. Se contempla especialmente que una "célula osteogénica" abarca una célula comúnmente denominada osteoblasto u osteocito. Ver la Sección 5.1.6, más adelante, para condiciones ejemplares en las cuales una célula adherente placentaria osteogénica puede diferenciarse en una célula que puede depositar hidroxiapatita.

Tal como se utiliza en la presente, una "matriz" se refiere a una sustancia tridimensional que se caracteriza por poros dispersados en toda la sustancia. Los poros son adecuados, por ejemplo, para el crecimiento de células, por ejemplo, células madre, OPAC y/o células osteogénicas, dentro de la matriz. Matrices ejemplares incluyen, a modo no taxativo, un sustrato de β -fosfato tricálcico, un sustrato de β -fosfato-colágeno tricálcico, un sustrato de colágeno, un sustrato de fosfato de calcio, un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado, un sustrato de ácido hialurónico y un sustrato cerámico. Preferiblemente, la matriz puede mineralizarse mediante una célula osteogénica presente en los poros de la matriz.

4. Breve descripción de las figuras

FIG. 1: Expresión génica de OPAC obtenida por adhesión selectiva. Eje X: cuantificación relativa de \log_{10} de la expresión génica de fosfatasa alcalina. Eje Y: Condiciones experimentales.

FIG. 2: Inmunofenotipo de OPAC obtenidas por adhesión selectiva con respecto a CD34, CD105 y CD200. LN: laminina. VN: vitronectina. FN: fibronectina. COL: colágeno. 10:10% de suero bovino fetal. 20:20% de suero bovino fetal. Testigo: cultivo de las OPAC en el recubrimiento de superficie indicado durante 6 días.

FIG. 3: Inmunofenotipo de marcadores osteogénicos de las OPAC obtenidas por adhesión selectiva. LN: laminina. VN: vitronectina. FN: fibronectina. COL: colágeno. 10:10% de suero bovino fetal. 20:20% de suero bovino fetal. Testigo: cultivo de las OPAC en el recubrimiento de superficie indicado durante 6 días. Asteriscos: diferencia sustancial en comparación con el control de células madre placentarias CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺ (línea horizontal).

FIG. 4: Inmunofenotipo de marcadores de células madre embrionarias de las OPAC obtenidas por adhesión selectiva. LN: laminina. VN: vitronectina. FN: fibronectina. COL: colágeno. 10:10% de suero bovino fetal. 20:20% de suero bovino fetal. Testigo: cultivo de las OPAC en el recubrimiento de superficie indicado durante 6 días. Línea horizontal superior: expresión de célula madre placentaria CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺ de SSEA-3; línea horizontal inferior: expresión de célula madre placentaria CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺ de SSEA-4.

FIG. 5: Actividad de fosfatasa alcalina (AP) de las OPAC obtenidas por adhesión selectiva.

FIG. 6: Inmunofenotipo de las OPAC de cultivo expandidas.

FIG. 7: Actividad de fosfatasa alcalina de las OPAC expandidas de cultivo. Basal: medio de crecimiento. OS: medio osteogénico, m1: medio 1 - 20% FBS (Hyclone)/ α -MEM que comprende 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina. m2: medio 2 - Medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM; Lonza). m3: medio 3 - 10% FBS (FBS calificado de células madre mesenquimales, Stem Cell Technologies)/ α -MEM que comprende 100 Unidades/mL, 100 μ g/mL de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina.

FIG. 8: Inmunofenotipo (CD200, CD105) de OPAC después de clasificación celular activada magnética. LN: laminina. VN: vitronectina. FN: fibronectina. m1: medio 1 - 20% FBS (Hyclone)/ α -MEM que comprende 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina. m3: medio 3 - 10% FBS (FBS calificado de células madre mesenquimales, Stem Cell Technologies)/ α -MEM que comprende 100 Unidades/mL, 100 μ g/mL de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina.

- 5 FIG. 9: Actividad de fosfatasa alcalina de una población CD200⁺ y una fracción no retenida (que comprende células CD200⁻) después de clasificación celular activada magnética. LN: laminina. VN: vitronectina. FN: fibronectina. m1: medio 1 - 20% FBS (Hyclone)/α-MEM que comprende 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 2 mM de L-glutamina. m3: medio 3 - 10% FBS (FBS calificado de células madre mesenquimales, Stem Cell Technologies)/α-MEM que comprende 100 Unidades/mL, 100 µg/mL de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Basal: expresión de AP en un medio de crecimiento. Inducido: expresión de AP en un medio osteogénico.
- 10 FIG. 10: Unidad de formación de colonias - actividad de fosfatasa (CFU-AP) de las poblaciones de células madre derivadas del corion después de una clasificación celular activada magnética. LN: laminina. VN: vitronectina. FN: fibronectina. m1: medio 1 - 20% FBS (Hyclone)/α-MEM que comprende 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 2 mM de L-glutamina. m3: medio 3 - 10% FBS (FBS calificado de células madre mesenquimales, Stem Cell Technologies)/α-MEM que comprende 100 Unidades/mL, 100 µg/mL de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. La condición CD200⁺ es sustancialmente cero para la expresión de AP.
- 15 FIG. 11: Formación de colonias total de fracciones de OPAC después de una clasificación celular activada magnética. FN: fibronectina. m1: medio 1 - 20% FBS (Hyclone)/α-MEM que comprende 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 2 mM de L-glutamina. m3: medio 3 - 10% FBS (FBS calificado de células madre mesenquimales, Stem Cell Technologies)/α-MEM que comprende 100 Unidades/mL, 100 µg/mL de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. PDAC: células multipotentes placentarias adherentes al plástico para cultivo tisular CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺.
- 20 FIG. 12: Secreción de osteoprotegerina inducible por OPAC después de estimulación osteogénica.
- FIG. 13: Lista de proteínas secretadas identificadas en OPAC, PDACTM, MSC y fibroblastos utilizando el Ensayo de anticuerpos basado en etiquetas de biotina RayBio® de la proteína RayBiotech 507. La expresión de proteínas se clasifica como + (baja), ++ (media) y +++ (alta) en comparación con un testigo positivo interno. Se indica la participación de la proteína en la formación (↑) o resorción (↓) de huesos.
- 25 FIG. 14: Cantidad media de formación de tejido óseo mediante un grupo de tratamiento; puntuada como 0-4, con 4 como la mayor cantidad.
- FIG. 15: Densidad mineral ósea del sitio del defecto craneal por grupo de tratamiento.
- FIG. 16: Distribución de animales con >50% de cierre de un defecto según se determinó por una medición del defecto residual de escaneos de rayos X al momento del sacrificio.
- 30 FIG. 17: Efectos de OPAC y MSC en diferenciación osteoclástica. OC: osteoclasto. testigo: osteoclastos sin OPAC o MSC.
- FIG. 18: Efecto de las OPAC y MSC en la proliferación de células de mieloma múltiple. OB: osteoblastos o células similares a osteoblastos obtenidas de MSC o PDAC en condiciones osteogénicas. MTT OD: densidad óptica en ensayo MMT; valores más altos indican un grado más alto de supervivencia de células de mieloma múltiple. Con MM: Células de mieloma múltiple de 27 pacientes humanos con mieloma múltiple.
- 35 FIG. 19: Efecto de las OPAC en la densidad mineral ósea en ratones SCID-rab mielomatosos primarios. Testigo: sólo PBS. Pre-receta: densidad mineral ósea (BMD) antes de la administración de OPAC. Final: Densidad mineral ósea después de 8-16 semanas después de la inyección. Los cambios en la densidad mineral ósea (BMD) de los huesos implantados se determinaron utilizando un PIXImus DEXA (GE Medical Systems LUNAR, Madison, WI).
- 40 FIG. 20: Efecto de las OPAC en niveles de inmunoglobulina humana (hlg) en ratones mielomatosos primarios. Ig: Inmunoglobulina humana en sueros de ratones.
- FIG. 21: Efecto de OPAC en la masa ósea en ratones SCID-rab mielomatosos primarios. BMD: densidad mineral ósea. BMC: contenido mineral óseo.

5. Descripción detallada

5.1 Células adherentes placentarias osteogénicas (OPAC)

45 5.1.1 Características

5.1.1.1 *Características físicas y morfológicas*

50 Las células adherentes placentarias osteogénicas (OPAC) para uso de acuerdo con la invención, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivos celulares, se adhieren al sustrato de cultivo tisular, por ejemplo, superficie de un recipiente para cultivo tisular (por ejemplo, plástico para el cultivo tisular). Las OPAC en cultivo asumen una apariencia estrellada, generalmente fibroblastoide, con un número de procesos citoplásmicos que se extienden del cuerpo celular central. Sin embargo, las OPAC son morfológicamente distinguibles de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que las OPAC generalmente exhiben un número mayor de dichos procesos que los

fibroblastos. Morfológicamente, las OPAC también son distinguibles de las células madre hematopoyéticas, que generalmente asumen una morfología más redondeada o de adoquín en cultivo.

5.1.1.2 *Marcadores de superficie celular, moleculares y genéticos*

5 Una OPAC (célula adherente placentaria osteogénica) aislada para uso de acuerdo con la invención es una célula aislada que es adherente, osteogénica y está aislada del corion. En una realización, las OPAC no están aisladas del contorno coriónico (liso). Las OPAC proporcionadas en la presente y poblaciones de OPAC expresan una pluralidad de marcadores celulares y genéticos que pueden utilizarse para identificar y/o aislar las OPAC o poblaciones de células que comprenden las OPAC. Las OPAC y poblaciones de células comprenden las OPAC proporcionadas en la presente, incluyen las OPAC y poblaciones de células que contienen OPAC obtenidas directamente del corion, por ejemplo, cultivos primarios. Las poblaciones de OPAC también incluyen poblaciones de, por ejemplo, dos o más OPAC en cultivo, OPAC en una suspensión de una sola célula y una población en un recipiente, por ejemplo, una bolsa. En una realización específica, la población de OPAC es una pluralidad de OPAC en un cultivo celular. Las OPAC no son trofoblastos, citotrofoblastos, células madre embrionarias o células germinales embrionarias, dado que esas células son conocidas y se entienden en la técnicas.

15 Una OPAC aislada para uso de acuerdo con la invención es CD200⁻ o CD200^{tenue}. En una realización específica, una OPAC es osteogénica. En una realización específica, una OPAC es positiva para la secreción de osteoprotegerina (OPG; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank AAB53709). La osteoprotegerina es un receptor señuelo secretado por osteoblastos que se une específicamente al factor de diferenciación de osteoclastos e inhibe la maduración de osteoclastos. Por lo tanto, las OPAC promueven la formación ósea y reducen la pérdida ósea mediada por osteoclastos. En otra realización específica, una OPAC es negativa para la expresión de RANKL (Receptor activador del factor nuclear κB). RANKL es una proteína que activa osteoclastos, que participan en la resorción ósea. Por lo tanto, las OPAC no promueven la resorción ósea. En otra realización específica, una OPAC es CD200⁻ o CD200^{tenue} y CD105⁺. En otra realización específica, una OPAC es negativa para la expresión de α-actina de músculo liso, por ejemplo, según se determina por tinción inmunofluorescente. Cabe señalar que otras poblaciones de células de placenta, por ejemplo, las células descritas en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2005/0058631, son positivas para la α-actina de músculo liso. En otra realización específica, una OPAC es una o más de negativa para la expresión de α-actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL o positiva para la expresión de NG2 (proteoglicano de sulfato de condroitina de célula neuroglial 2). En otra realización específica, una OPAC es negativa para la expresión de α-actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2 y positiva para la secreción de osteoprotegerina. En otra realización específica, una OPAC exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible. En una realización más específica, una OPAC es CD200⁻ o CD200^{tenue} y CD105⁺ y es una o más de negativa para la expresión de α-actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible. En otra realización más específica, una OPAC es CD200⁻ o CD200^{tenue} y CD105⁺ y también es negativa para la expresión de α-actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina y exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible. La falta de expresión o la expresión baja, de CD200 por las OPAC distingue las OPAC de otras células multipotentes derivadas de placenta adherentes al plástico para cultivo tisular, por ejemplo, PDACsTM, por ejemplo, las células multipotentes placentarias descritas en Edinger et al, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2007/0275362.

45 En otra realización específica, una OPAC es SSEA3⁺ o SSEA4⁺. En una realización más específica, una OPAC es SSEA3⁺ y SSEA4⁺. En otra realización más específica, una OPAC es CD200⁻ o CD200^{tenue} y CD105⁺, SSEA3⁺ y también es negativa para la expresión de α-actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina y/o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible. En otra realización más específica, una OPAC es CD200⁻ o CD200^{tenue} y CD105⁺, SSEA4⁺ y también es negativa para la expresión de α-actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible. En una realización más específica, una OPAC es CD200⁻ o CD200^{tenue}, CD105⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺ y también es negativa para la expresión de α-actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible. La expresión de SSEA3 y SSEA4 por las OPAC sirven para distinguir las OPAC de otras células derivadas de placenta, por ejemplo, células madre placentarias adherentes al plástico para el cultivo tisular descritas en Hariri, Patente de los Estados Unidos No. 7.468.276.

55 En ciertas realizaciones, una OPAC facilita la formación de una matriz mineralizada en una población de células placentarias cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de una matriz mineralizada.

60 La invención también se refiere a poblaciones de células que comprenden OPAC, en donde la población de células es CD200⁻ o CD200^{tenue}. Por ejemplo, una población aislada de células que comprende OPAC no está aislada del contorno coriónico (liso) y es CD200⁻ o CD200^{tenue}. La población de células puede consistir esencialmente en OPAC, y ser osteogénica. Dicha población de células puede ser CD200⁻ y CD105⁺ según se detecta por citometría de flujo, o CD200^{tenue} y CD105⁺ según se detecta por citometría de flujo. Dicha población de células puede ser negativa para

la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2 y/o positiva para la secreción de osteoprotegerina. Dicha población de células puede ser negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2 y positiva para la secreción de osteoprotegerina. Dicha población de células puede exhibir actividad de fosfatasa alcalina inducible. Específicamente, dicha población puede ser CD200⁻, CD105⁺ o CD200^{tenue}, CD105⁺ y también ser una o más de negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibir actividad de fosfatasa alcalina inducible. Más específicamente, dicha población de células puede ser CD200⁻, CD105⁺ o CD200^{tenue}, CD105⁺; ser negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina y exhibir actividad de fosfatasa alcalina inducible.

Dicha población de células puede ser SSEA3⁺ o SSEA4⁺. Alternativamente, dicha población de células puede ser SSEA3⁺ y SSEA4⁺. Dicha población de células puede ser CD200⁻ y/o CD200^{tenue}, CD105⁺, SSEA3⁺ y también es negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible. Más específicamente, dicha población de células puede ser CD200⁻ o CD200^{tenue}, ser CD105⁺ y SSEA4⁺ y también ser negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible. Más específicamente, dicha población de células puede ser CD200⁻ o CD200^{tenue}, ser CD105⁺, SSEA3⁺, SSEA4⁺, negativa para la expresión de α -actina de músculo liso, negativa para la expresión de RANKL, positiva para la expresión de NG2, positiva para la expresión de osteoprotegerina y/o exhibir actividad de fosfatasa alcalina inducible.

En realizaciones específicas, al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células de acuerdo con la invención son CD200⁻.

La invención también se refiere a una población aislada de OPAC, en donde dicha población se produce aislando el tejido coriónico de una placenta, en donde dicho tejido coriónico no es un tejido del contorno coriónico (liso); digiriendo el tejido coriónico aislado con una enzima que altera el tejido para obtener una población de células coriónicas que comprenden OPAC; y aislando dichas OPAC de dichas células coriónicas. En una realización específica, la enzima que altera el tejido es tripsina, dispasa o colagenasa. En varias realizaciones, las células madre coriónicas, contenidas dentro de una población de células obtenidas de digerir tejido coriónico, constituyen al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% de dicha población de células coriónicas.

Poblaciones aisladas de células que comprenden OPAC, por ejemplo, poblaciones de OPAC, son distinguibles de otras células, por ejemplo, células adherentes derivadas de placenta CD200⁺, no tenues, (denominadas en la presente PDACTM), según se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nos. 7.468,276 y 7.255.879, y en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2007/02753621, por ejemplo, según se muestra mediante perfiles genéticos. Se identifican PDACTM, por ejemplo, como células CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺, no tenues de la placenta o cordón umbilical, que son adherentes a superficies de cultivo tisular, por ejemplo, plástico para cultivo tisular. PDACTM pueden caracterizarse además como células CD10⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺ de la placenta o cordón umbilical, que son adherentes a superficies de cultivo tisular, por ejemplo, plástico para cultivo tisular. En una realización específica, la población de células para uso de acuerdo con la invención consiste esencialmente en OPAC.

Las OPAC descritas en la presente pueden distinguirse de las PDACTM en base a la expresión de uno o más genes, siendo la expresión o el grado de expresión específicos para las OPAC en comparación con las PDACTM. Por ejemplo, OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos (PDACTM) en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP6 (proteína morfogenética ósea 6; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM 001718), CDH11 (cadherina 11, tipo 2, cadherina de osteoblasto; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001797), COL10A1 (colágeno, tipo X, alfa 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM 000493), COL14A1 (colágeno, tipo XIV, alfa 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM 0211 10), COL15A1 (colágeno, tipo XV, alfa 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001855), COL1A1 (colágeno, tipo I, alfa 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000088), COL1A2 (colágeno, tipo I, alfa 2; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM 000089), COL3A1 (colágeno, tipo III, alfa 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM 000090), COL4A3 (colágeno, tipo IV, alfa 3; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM 000091), COL5A1 (colágeno, tipo V, alfa 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000093), CSF3 (factor 3 de estimulación de colonias (granulocito); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM 000759), CTSK (cathepsina K; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM 000396), IGF1R (receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000875), MINPP1 (inositol polifosfato histidina fosfatasa 1 múltiple; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_004897), MMP2 (metaloproteasa de la matriz 2 (también conocida como gelatinasa A, gelatinasa de 72 kDa, colagenasa tipo IV de 72 kDa); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_004530), MMP9 (metalopeptidasa de la matriz 9 (también conocida como gelatinasa B, gelatinasa de 92kDa, colagenasa tipo IV de 92kDa); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_004994), MSX1 (msh homeobox 1; ver, por ejemplo, No.

de acceso de GenBank NM_002448), SMAD1 (miembro de la familia de SMAD 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001003688), SMAD3 (miembro de la familia de SMAD 3; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_005902), TGFB3 (factor de transformación de crecimiento, beta 3; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_003239), TGFB1 (factor de transformación de crecimiento, beta receptor 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_004612) y VEGFB (factor de crecimiento endotelial vascular B; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank XM_001128909), cuando las OPAC y células madre placentarias se cultivan en condiciones equivalentes, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En otra realización, la presente invención proporciona una población de OPAC, en donde dicha población de células expresa uno o más genes a un nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP3 (proteína morfogenética ósea 3; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001201), CDH11, COL10A1, COL14A1, COL15A1, DMP1 (fosfoproteína ácida de la matriz de la dentina 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NG_008988), DSPP (sialofosfoproteína de la dentina; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_014208), ENAM (enamelina; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_031889), FGFR2 (receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000141), MMP10 (metaloproteasa de la matriz 10 (estromelina 2); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_002425), TGFB3 y/o TGFB1 cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En una realización específica, dicho medio de crecimiento es α MEM/20% de suero bovino fetal que contiene 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina. En una realización específica, la población de células consiste esencialmente en OPAC.

En otra realización, las OPAC expresan uno o más genes a nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AMBN (ameloblastina (proteína de la matriz del esmalte); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_031889), BMP2 (proteína morfogenética ósea 2; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001200), CALCR (receptor de calcitonina; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001742), CDH11, COL11A1 (colágeno tipo XI, alfa 1; NM_001854), COL14A1, COL15A1, COL2A1 (colágeno tipo II, alfa 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001844), CSF2 (factor 2 estimulante de la colonia; NM_000758), CSF3, DMP1, DSPP, ENAM, FGF3, GDF10 (factor 10 de diferenciación de crecimiento; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_004962), IGF1 (factor 1 de crecimiento similar a la insulina; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000618), ITGA1 (integrina, alfa 1 (CD49); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_181501), ITGA2 (integrina, alfa 2 (CD49B); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_002203), MMP10, MMP8 (metaloproteasa de la matriz 8 (colagenasa de neutrófilos); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_002424), MMP9, PDGFA (factor de crecimiento derivado de plaquetas A; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank XM_001126441), SMAD1, TGFB3, TGFB1 y/o TGFB2 (factor de transformación de crecimiento beta, receptor 2; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001024847) cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio osteogénico, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En una realización específica, dicho medio de crecimiento es α MEM/20% de suero bovino fetal que contiene 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina, 50 μ g/mL de ácido ascórbico y 100 nM de dexametasona.

En otra realización, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de CDH11, COL14A1, COL15A1, DMP1, DSPP, ENAM, MMP10, TGFB3 y/o TGFB1, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

En otra realización, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más bajo) que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AHSG (glicoproteína alfa-2-HS; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001622), ALPL (fosfatasa alcalina de hígado/hueso/riñón); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000478), EGF (factor de crecimiento epidérmico; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001963), FLT1 (tirosina quinasa 1 relacionada con fms (factor de crecimiento endotelial vascular/receptor del factor de permeabilidad vascular); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_002019), IGF2, ITGA2, ITGAM (integrina, alfa M (subunidad 3 del receptor del componente 3 del complemento); ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000632), SCARB1 (receptor depurador clase B, miembro 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_005505), SOX9 (SRY (región de determinación sexual Y)-caja 9; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000346), TNF, TWIST1 (homólogo 1 de Twist; anteriormente blefarofimosis, epicanto inverso y ptosis 3, acrocefalosindactilia 3; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000474), VCAM1 (molécula 1 de adhesión celular vascular 1; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001078) y/o VDR cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

- 5 En otra realización, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más bajo) que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BGN, COL11A1, COMP (proteína oligomérica de la matriz del cartílago), FGF1 y/o VCAM1 cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio osteogénico, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En una realización específica, dicho medio osteogénico es α MEM/20% de suero bovino fetal que contiene 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycinina, 2 mM de L-glutamina, 50 μ g/mL de ácido ascórbico y 100 nM de dexametasona.
- 10 En otra realización, las OPAC expresan VCAM1 a un nivel notoriamente más bajo (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más bajo) que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.
- 15 Los perfiles genéticos también muestran que las OPAC aisladas son distinguibles de células madre mesenquimales, por ejemplo, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. En una realización las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP4, BMP6, CD36, CDH11, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL3A1, COL5A1, CSF2, CTSK, FGF2, FGFR1, FLT1, ITGA1, MINPP1, MMP9, MSX1, PDGFA, SERPINH1, TGFB3 y TGFBR1, cuando las OPAC y células madre se cultivan en condiciones equivalentes, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.
- 20 En otra realización, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP4, CALCR, CD36, CDH11, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL3A1, COL5A1, DMP1, DSPP, FLT1, MSX1, PDGFA, TGFB3, TGFBR1 y/o TUFT1, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En una realización específica, dicho medio de crecimiento es α MEM/20% de suero bovino fetal que contiene 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycinina y 2 mM de L-glutamina.
- 25 En otra realización, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AMBN, CALCR, COL14A1, COL15A1, CSF3, DMP1, DSPP, ITGA1, ITGA2, MMP10, MMP9, MSX1, PDGFA, TGFB1, TGFB3, TGFBR1 y/o TGFBR2, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio osteogénico, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En una realización específica, dicho medio osteogénico es α MEM/20% de suero bovino fetal que contiene 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycinina, 2 mM de L-glutamina, 50 μ g/mL de ácido ascórbico y 100 nM de dexametasona.
- 30 En otra realización, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de CALCR, COL14A1, COL15A1, DMP1, DSPP, MSX1, PDGFA, TGFB3 y/o TGFBR1, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.
- 35 En otra realización, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de ALPL, BGLAP, IGF2, ITGA2, ITGAM, SCARB1 y/o SOX1, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio crecimiento, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En una realización específica, dicho medio de crecimiento es α MEM/20% de suero bovino fetal que contiene 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycinina y 2 mM de L-glutamina. En otra realización, las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más bajo) que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AHSG, ALPL, BGLAP, BGN, BMP3, BMP5, CD36, COL10A1, COL11A1, COL12A1, COL2A1, COL4A3, COMP, EGF, FGF1, FGFR2, IGF2, MMP8, PHEX, RUNX2 (factor de transcripción 2 relacionado con Runt; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_001015051), SCARB1, SOX1, VCAM1 y/o VEGFB, cuando las OPAC y células madre mesenquimales se cultivan en un medio osteogénico, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En una realización específica, dicho medio osteogénico es α MEM/20% de suero bovino fetal que contiene 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycinina, 2 mM de L-glutamina, 50 μ g/mL de ácido ascórbico y 100 nM de dexametasona.
- 45
- 50
- 55

5 En otra realización, la presente invención proporciona una población de OPAC, en donde dicha población de células, por ejemplo, las OPAC, expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más bajo) que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de ALPL, BGLAP, IGF2, SCARB1 y/o SOX9, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real. En otra realización específica, la población de células consiste esencialmente en OPAC.

10 En otra realización las OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes y un número de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de COL14A1, COL14A2, DMP, DSPP, TGFB3 y/o TGFBR1, independientemente de si dichas OPAC, células madre placentarias y dichas células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

15 Los perfiles genéticos también confirman que las OPAC son distinguibles de células de fibroblastos dérmicas humanas. En una realización, OPAC expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto (por ejemplo, un nivel al menos dos veces más alto) que un número equivalente de células de fibroblastos dérmicas, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP4, BMP6, CDH11, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL3A1, COL5A1, FLT1, IGF1R, ITGA1, MINPP1, PDGFA, SERPINH1, SMAD3, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TNF, TUFT1, VCAM1 y VEGFA, en donde la expresión de estos genes es mayor en las OPAC que en células de fibroblastos, cuando las OPAC y fibroblastos se cultivan en condiciones equivalentes, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

25 En otra realización, un aumento en la expresión en las OPAC, de uno o más genes en un medio osteogénico, en comparación con el medio de crecimiento, es al menos diez veces más alto que un aumento en dicho gen o genes en un medio osteogénico, en comparación con un medio de crecimiento, en un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes, en donde dichas células madre placentarias CD200⁺ adherentes no son trofoblastos ni citotrofoblastos y en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP2, CSF3, ITGA2, MMP9, MMP10 y/o TGFB2.

30 En otra realización, un aumento en la expresión en las OPAC, de uno o más genes en un medio osteogénico, en comparación con el medio de crecimiento, es al menos diez veces más alto que un aumento en dicho gen o genes en un medio osteogénico, en comparación con un medio de crecimiento, en un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes, en donde dichas células madre placentarias CD200⁺ adherentes no son trofoblastos ni citotrofoblastos y en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de COL1A1, COL11A1, COL4A3, COL5A1, COMP (proteína oligomérica de la matriz del cartílago; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000095), CTSK, FGF1 (factor 1 de crecimiento de fibroblastos; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000800) y/o FGFR2.

35 En otra realización, un aumento en la expresión en las OPAC, de uno o más genes en un medio osteogénico, en comparación con un medio de crecimiento, es al menos diez veces más alto que un aumento en dicho gen o genes en un medio osteogénico, en comparación con un medio de crecimiento, en un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, y en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de CSF3, IGF2, ITGA2, ITGA3, MMP9, MMP10 y/o TGFB2.

40 En otra realización, un aumento en la expresión en las OPAC, de uno o más genes en un medio osteogénico, en comparación con un medio de crecimiento, es al menos diez veces más bajo que un aumento en dicho gen o genes en un medio osteogénico, en comparación con un medio de crecimiento, en un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, y en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de ALPL (fosfatasa alcalina, hígado/hueso/riñón), CD36, COL10A1, COL11A1, COL12A1, COL1A1, COL4A3, COMP, CTSK, FGF1 y/o FGFR2.

45 En otra realización, un aumento en la expresión en las OPAC, de uno o más genes en un medio osteogénico, en comparación con un medio de crecimiento, es al menos diez veces más alto que un aumento en dicho gen o genes en un medio osteogénico, en comparación con un medio de crecimiento, en un número equivalente de células de fibroblastos, y en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP2, CSF2, CSF3, IGF1, ITGA2, MMP9 y/o MMP10.

50 En otra realización, un aumento en la expresión en las OPAC, de uno o más genes en un medio osteogénico, en comparación con un medio de crecimiento, es al menos diez veces más bajo que un aumento en dicho gen o genes en un medio osteogénico, en comparación con un medio de crecimiento, en un número equivalente de células de fibroblastos, y en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP4, COL12A1, COMP, FGF1 y/o MMP8.

En otra realización, un gen que codifica metalopeptidasa de la matriz 9 (MMP9) se induce en dichas OPAC en un medio osteogénico, en comparación con la expresión de MMP9 en un medio de crecimiento, al menos 2, 3, 4 o 5 órdenes de magnitud más que lo que dicha MMP9 se induce en dicho medio osteogénico, en comparación con la expresión de MMP9 en dicho medio de crecimiento, por ejemplo, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

En otra realización, las OPAC expresan uno o más genes al menos diez veces más que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺, no tenues, adherentes, en donde dicho gen o genes son CHRD (cordina; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_003741), GDF7 (factor 7 de diferenciación de crecimiento; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_182828), IGFBP3 (proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 3; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_000598) y/o INHA (inhibina alfa; ver, por ejemplo, No. de acceso de GenBank NM_002191). En otra realización, las OPAC expresan TGFB2 en un nivel al menos diez veces más bajo que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺ (no tenues) adherentes.

En otras realizaciones las OPAC expresan α -actina de músculo liso, según se detecta mediante tinción inmunofluorescente y expresan un gen de fibronectina 1 (FN1) y/o gen TGF- β 2 (TGFB2) a aproximadamente el mismo nivel o un nivel más alto en comparación con un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

El nivel de expresión de estos genes puede utilizarse para confirmar la identidad de una población de OPAC, para identificar una población de células que comprenden al menos una pluralidad de OPAC o similares. La población de OPAC puede ser clonal, por ejemplo, una población de OPAC expandida de una sola OPAC o una población mixta de OPAC, por ejemplo, una población de células que comprenden únicamente OPAC que se expanden de múltiples OPAC, o una población de células que comprenden OPAC y al menos otro tipo de célula.

El nivel de expresión de estos genes puede utilizarse para seleccionar poblaciones de OPAC. Por ejemplo, una población de células, por ejemplo, células expandidas clonalmente, pueden seleccionarse si la expresión de uno o más de estos genes es significativamente más alta en una muestra de la población de células que en una población equivalente de células madre mesenquimales. Dicha selección puede ser de una población de una pluralidad de poblaciones de células madre coriónicas o células madre placentarias, de una pluralidad de poblaciones de células, cuya identidad no se conoce, etc.

Las OPAC para uso de acuerdo con la invención pueden seleccionarse en base al nivel de expresión de uno o más de dichos genes en comparación con el nivel de expresión en dicho gen o genes en un control de células madre mesenquimales. En una realización, el nivel de expresión de dicho gen o genes en una muestra que comprende un número equivalente de células madre mesenquimales se utiliza como un testigo. En otra realización, el testigo, para las OPAC evaluadas en determinadas condiciones, es un valor numérico que representa el nivel de expresión de dicho gen o genes en células madre mesenquimales en dichas condiciones.

Las OPAC para uso de acuerdo con la invención también pueden seleccionarse en base a la expresión de una o más proteínas secretadas en comparación con el nivel de expresión en un testigo, por ejemplo una célula madre placentaria, una célula madre mesenquimal o una célula de fibroblasto. En una realización, las OPAC puede distinguirse de células madre placentarias, células madre mesenquimales o células de fibroblastos en base a la secreción de uno o más de decorina, epirregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, proteína de unión a TGF-beta latente 1 (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 y TIMP-2, que son únicos de las OPAC en comparación con células madre placentarias CD200⁺ (no tenues) adherentes, células madre mesenquimales o células de fibroblastos. En otra realización, las proteínas secretadas por las OPAC pero no por PDACTM incluyen uno o más de Factor tisular, Folistatina tipo 1, IGF-1IR, sFRP-4 y TSG-6.

Las poblaciones aisladas de OPAC y las poblaciones de OPAC en general pueden comprender aproximadamente, al menos, o no más que, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más OPAC.

5.1.1.3 Crecimiento en cultivo

El crecimiento de las OPAC, para cualquier célula de mamífero, depende en parte del medio particular seleccionado para el crecimiento. En condiciones óptimas, las OPAC típicamente se duplican en número en 1-3 días. Durante el cultivo, las OPAC proporcionadas en la presente se adhieren a un sustrato en cultivo, por ejemplo, la superficie de un recipiente para cultivo tisular (por ejemplo, plástico de plato para cultivo tisular, plástico recubierto con fibronectina y similares) y forman una monocapa.

5.1.2 Métodos para obtener OPAC

5.1.2.1 Composición de recolección de células

En la presente también se divulgan métodos para recolectar y aislar OPAC. Generalmente, las OPAC se obtienen del corion utilizando una solución fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una composición de recolección de

células. Una composición de recolección de células se describe en detalle en la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos No. 2007-0190042.

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

10 La composición de recolección de células puede comprender uno o más componentes que tienden a preservar las OPAC, es decir, prevenir que las OPAC mueran o retrasar la muerte de las OPAC, reducir el número de OPAC en una población de células que muere, o similar, desde el momento de recolección al momento de cultivo. Dichos componentes pueden ser, por ejemplo, un inhibidor de la apoptosis (por ejemplo, un inhibidor de caspasa o inhibidor de JNK); un vasodilatador (por ejemplo, sulfato de magnesio, un fármaco antihipertensivo, péptido natriurético auricular (ANP), adrenocorticotropina, hormona liberadora de corticotropina, nitroprusiato de sodio, hidralazina, adenosina trifosfato, adenosina, indometacina o sulfato de magnesio, un inhibidor de fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de necrosis (por ejemplo, 2-(1H-Indol-3-il)-3-pentilamina-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina o clonazepam); un inhibidor TNF- α ; y/o un perfluorocarbono portador de oxígeno (por ejemplo, bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

15 La composición de recolección de células puede comprender una o más enzimas que degradan el tejido, por ejemplo, una metaloproteasa, una proteasa de serina, una proteasa neutral, una RNasa o una DNasa o similar. Dichas enzimas incluyen, a modo no taxativo, colagenasas (por ejemplo, colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASA, hialuronidasa y similares.

20 La composición de recolección de células puede comprender una cantidad bactericidamente o bacterioestáticamente efectiva de un antibiótico. En determinados aspectos no taxativos, el antibiótico es un macrólido (por ejemplo, tobramicina), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxilo), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (por ejemplo, penicilina V) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacin, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En un aspecto particular, el antibiótico es activo contra bacterias Gram(+) y/o Gram(-), por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y similares.

25 La composición de recolección de células también puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM); iones magnesio (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); una macromolécula de peso molecular mayor que 20.000 daltones, en un aspecto, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad endotelial y viabilidad celular (por ejemplo, un coloide natural o sintético, un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (por ejemplo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatona, vitamina C o vitamina E presentes de aproximadamente 25 μ M a aproximadamente 100 μ M); un agente reductor (por ejemplo, N-acetilcisteína presente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que previene la entrada de calcio en las células (por ejemplo, verapamil presente de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 25 μ M); nitroglicerina (por ejemplo, aproximadamente 0.05 g/L a aproximadamente 0,2 g/L); un anticoagulante, en un aspecto, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de sangre residual (por ejemplo, heparina o hirudina presentes a una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (por ejemplo, amilorida, etil isopropil amilorida, hexametilen amilorida, dimetil amilorida o isobutil amilorida presente de aproximadamente 1,0 μ M a aproximadamente 5 μ M).

5.1.2.2 Recolección y manipulación de placenta

35 Generalmente, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento. En un aspecto preferido, la placenta se recupera de una paciente después del consentimiento informado y después de un historial clínico completo del paciente y de asociarlo con la placenta. Preferiblemente, el historial clínico continúa después del parto. Dicho historial clínico puede utilizarse para coordinar un uso posterior del corion u OPAC aislados de la misma. Por ejemplo, las OPAC pueden utilizarse, a la luz del historial clínico, para medicina personalizada para el bebé asociado con la placenta de la cual se obtiene el corion o para los padres, hermanos u otros familiares del bebé.

40 En algunos aspectos, antes de recuperar las OPAC, la sangre del cordón umbilical y la sangre de la placenta se retiran de la placenta de la cual se retirará el corion. En algunos aspectos, después del parto, se recupera la sangre del cordón en la placenta. La placenta puede someterse a un proceso convencional de recuperación de sangre del cordón. Típicamente se utiliza una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para desangrar la placenta (ver, por ejemplo, Anderson, Patente de los Estados Unidos No. 5.372.581; Hessel et al, Patente de los Estados Unidos No. 5.415.665). La aguja o cánula se coloca generalmente en la vena umbilical y la placenta puede masajearse suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón de la placenta. Dicha recuperación de la sangre del cordón puede realizarse comercialmente, por ejemplo, LifeBank USA, Cedar Knolls, N. J., ViaCord, Cord Blood Registry y

Cryocell. Preferiblemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional para minimizar la alteración del tejido durante la recuperación de la sangre del cordón.

Típicamente, una placenta se transporta de la sala o habitación de parto a otra ubicación, por ejemplo, un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y recolección de células. La placenta preferiblemente se transporta en un dispositivo de transporte térmicamente aislado, estéril (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28°C), por ejemplo, mediante la colocación de la placenta, con el cordón umbilical próximo sujetado, en una bolsa de plástico con cierre estéril, que se coloca entonces en un recipiente aislado. En otro aspecto, la placenta se transporta en un kit de recolección de sangre del cordón básicamente como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos pendiente No. 11/230.760, presentada el 19 de septiembre de 2005. Preferiblemente, la placenta se entrega al laboratorio de cuatro a veinticuatro horas después del parto. En determinados ejemplos, el cordón umbilical próximo se sujeta, preferiblemente dentro de los 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de la sangre del cordón. En otro ejemplo, el cordón umbilical próximo se sujeta después de la recuperación de la sangre del cordón pero antes de un proceso adicional de la placenta.

La placenta, antes de la recolección de las OPAC, puede almacenarse en condiciones estériles y ya sea a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25°C (centígrados). La placenta puede almacenarse durante un período no mayor a cuarenta y ocho horas, y preferiblemente durante un período de cuatro a veinticuatro horas antes de la perfusión de la placenta para retirar toda sangre del cordón residual. La placenta preferiblemente se almacena en una solución anticoagulante a una temperatura de 5 a 25°C (centígrados). Las soluciones anticoagulantes adecuadas se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse una solución de heparina o warfarina de sodio. En un aspecto preferido, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (por ejemplo, 1% p/p en solución 1:1000). La placenta desangrada preferiblemente se almacena por no más de 36 horas antes de recolectar las OPAC.

5.1.2.3 Alteración física y digestión enzimática de tejido de corion

En un aspecto, las OPAC para uso de acuerdo con la invención se pueden recoger de una placenta de mamífero mediante la alteración física, por ejemplo, digestión enzimática del órgano. Por ejemplo, el corion o una porción del mismo puede, por ejemplo, triturarse, cortarse, picarse, cortarse en cubos, trozarse, macerarse o similar mientras está en contacto con la composición de recolección de células divulgada en la presente y el tejido resultante digerirse posteriormente con una o más enzimas. El corion o una porción del mismo también puede alterarse físicamente y digerirse con una o más enzimas y el material resultante puede sumergirse en, o mezclarse con, la composición de recolección de células. Puede utilizarse cualquier método de alteración física, siempre que el método de alteración deje una pluralidad, más preferiblemente una mayoría, y más preferiblemente al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicho órgano viable, según se determina, por ejemplo, por exclusión de azul de tripano. Típicamente, las OPAC pueden obtenerse mediante alteración de un pequeño bloque del corion, por ejemplo, un bloque de tejido placentario que es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o aproximadamente 1000 milímetros cúbicos de volumen.

Una composición de recolección de células preferida comprende una o más enzimas que alteran el tejido. La digestión enzimática del corion preferiblemente utiliza una combinación de enzimas, por ejemplo, una combinación de una metaloproteasa de la matriz y una proteasa neutral, por ejemplo, una combinación de colagenasa y dispasa. En otros aspectos, la digestión enzimática del tejido coriónico utiliza una combinación de una metaloproteasa de la matriz, una proteasa neutral y una enzima mucolítica para la digestión de ácido hialúrico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa y hialuronidasa o una combinación de LIBERASA (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.) e hialuronidasa. Otras enzimas que pueden utilizarse para alterar el tejido coriónico incluyen papaína, desoxirribonucleasa, proteasas de serina, tales como tripsina, quimotripsina o elastasa. Las proteasas de serina pueden ser inhibidas por alfa 2 microglobulina en suero y por lo tanto el medio que se utiliza para la digestión está generalmente libre de suero. La EDTA y DNasa se utilizan comúnmente en los procedimientos de digestión de enzimas para aumentar la eficiencia de la recuperación de células. El digestato (tejido y células que resultan de una digestión enzimática) preferiblemente se diluye para evitar atrapar las OPAC dentro de la digestión viscosa.

Las concentraciones típicas para las enzimas de la digestión de tejido incluyen, por ejemplo, 50-200 U/mL para la colagenasa I y colagenasa IV, 1-10 U/mL para la dispasa y 10-100 U/mL para la elastasa. Las proteasas pueden utilizarse en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión o pueden utilizarse secuencialmente para liberar las OPAC. Por ejemplo, en una realización, el tejido coriónico se digiere primero con una cantidad apropiada de colagenasa I a 2 mg/ml durante 30 minutos, seguido por la digestión con tripsina, 0,25% durante 10 minutos, a 37°C. Las proteasas de serina preferiblemente se utilizan consecutivamente siguiendo el uso de otras enzimas.

Las OPAC para uso de acuerdo con la invención se pueden obtener mediante la separación de amnios del tejido coriónico; picando el tejido coriónico, por ejemplo, en trozos de aproximadamente 1 mm³; digiriendo el tejido en la dispasa II, por ejemplo, a aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 U/mL, por ejemplo, 2,4 U/mL por un tiempo suficiente, por ejemplo, aproximadamente 1 hora; digiriendo con la colagenasa II a aproximadamente 100, 200, 300, 400 o 500 U/mL, por ejemplo, aproximadamente 270 U/ml por un tiempo suficiente, por ejemplo 1 hora, seguido por la

neutralización de la enzima, recolección de células solas y cultivo de células coriónicas en un medio adecuado, por ejemplo, 20% de FBS/ α MEM.

5 En otro ejemplo, el tejido puede alterarse además mediante la adición de un quelante, por ejemplo, ácido etilenglicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) a la composición de recolección de células que comprende las células madre o a una solución en la cual el tejido se altera y/o digiere antes del aislamiento de las células madre con la composición de recolección de células.

10 Se apreciará que donde un corion entero o porción de un corion que comprende tanto células fetales como maternas, las OPAC recogidas pueden comprender una mezcla de OPAC derivadas tanto de fuentes fetales como maternas. Cuando una porción del corion que no comprende o comprende un número insignificante de células maternas (por ejemplo, amnios), las OPAC recogidas comprenderán casi exclusivamente células placentarias fetales.

15 Las OPAC para uso de acuerdo con la invención se pueden aislar del tejido coriónico como se describe a continuación. El tejido coriónico se obtiene y se pica, por ejemplo, en trozos de aproximadamente 1-2 mm³. El tejido picado se digiere con la dispasa II a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 1 U/mL a aproximadamente 10 U/mL, por ejemplo, 2,4 U/mL hasta que la digestión se complete, por ejemplo, durante 1 hora a 37°C. El tejido digerido se digiere con la colagenasa II, por ejemplo, aproximadamente 100 U/mL a aproximadamente 1000 U/mL, por ejemplo, aproximadamente 27 U/mL, hasta que la digestión se complete, por ejemplo, durante aproximadamente 1 hora a 37°C. Las células se recogen mediante centrifugación, se lavan y se cultivan en recipientes para cultivo tisular recubiertos con laminina o recubiertos con vitronectina y se cultivan en 20 10% de FBS/ α MEM o 20% de FBS/ α MEM durante aproximadamente 6 días. A los 6 días de cultivo, las células no adherentes se retiran y las células adherentes se dejan proliferar. Cuando las células logran de aproximadamente 80% a 90% de confluencia, las células se retiran, por ejemplo, utilizando tripsina y transfiriendo recipientes para cultivos tisulares recubiertos con vitronectina o recubiertos con laminina. Cuando las células se cultivan inicialmente en recipientes recubiertos con laminina, se prefiere que se transfieran a recipientes para cultivo recubiertos con laminina; de manera similar, cuando las células se cultivan inicialmente en recipientes recubiertos con vitronectina, se prefiere que se transfieran a recipientes para cultivo recubiertos con vitronectina. Las células opcionalmente se criopreservan antes de la transferencia a segundas placas. Las células se analizan, por ejemplo, mediante citometría de flujo y se determinan que son, por ejemplo, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁻ y/o CD200^{tenue}, positivas para fosfatasa alcalina (AP), α -actina de músculo liso (α -SMA) y osteoprotegerina (OP)

30 Por lo tanto, en un aspecto, en la presente se proporciona un método para aislar células adherentes placentarias osteogénicas (OPAC) que comprende digerir tejido de corion serialmente con dispasa II y luego con colagenasa II para producir una población de células; cultivar dicha población de células en una primera superficie recubierta con vitronectina o superficie recubierta con laminina durante aproximadamente seis días, en donde dicha población de células comprende células adherentes y células no adherentes; y remover células no adherentes; y transferir las 35 células adherentes a una segunda superficie recubierta con vitronectina o superficie recubierta con laminina, en donde dichas células adherentes son OPAC. En realizaciones específicas, dichas OPAC para uso de acuerdo con la invención son una o más de CD34⁻, CD105⁺, CD200^{tenue}, AP⁺, α -SMA⁺ y OP⁺. En otras realizaciones, las OPAC tienen cualquiera de las características celulares o genéticas descritas en otras partes en la presente.

5.1.3 Cultivo de OPAC

40 5.1.3.1 Medio de cultivo

Las OPAC o poblaciones de OPAC aisladas pueden utilizarse para iniciar o sembrar cultivos celulares. Las células se transfieren generalmente a recipientes para cultivo tisular estériles. Los recipientes preferiblemente se recubren con vitronectina, fibronectina o ambas. En otros ciertos aspectos, los recipientes para cultivo tisular no están recubiertos o están recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo 45 o desnaturalizado), gelatina, ornitina y/o proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

Preferiblemente, las OPAC se obtienen como se describe a continuación. Células coriónicas que comprenden las OPAC, obtenidas mediante la digestión de tejido coriónico, por ejemplo, con dispasa II y colagenasa II según se describió anteriormente, se cultivan inicialmente en una superficie de cultivo tisular recubierta con colágeno, vitronectina o laminina, por ejemplo, durante aproximadamente 1-6 días en 20% de FBS/ α MEM, seguido por, o 50 acompañado por, eliminación de células no adherentes; las células no adherentes pueden retirarse varias veces, por ejemplo, después de 3 horas, 1 día y 6 días del cultivo, o una vez, por ejemplo, después de 6 días de cultivo. Después de la adhesión selectiva, las OPAC se seleccionan mediante la eliminación de células CD200⁺ (no tenues), por ejemplo, utilizando un anticuerpo a CD200, dejando una población de células CD200^{tenue}/CD200⁻.

55 Las OPAC pueden cultivarse en cualquier medio y en cualquier condición reconocida en la técnica como aceptable para el cultivo de células madre. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende suero. Las OPAC pueden cultivarse en, por ejemplo, DMEM-LG (Medio Esencial Modificado por Dulbecco, baja glucosa)/MCDB 201 (medio basal de fibroblasto de pollo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA+BSA (ácido linoleico-albúmina de

suero de bovino), dextrosa, L-ácido ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1 y penicilina/estreptomina; DMEM-HG (alta glucosa) que comprende 10% de suero de bovino fetal (FBS); DMEM-HG que comprende 15% de FBS; IMDM (medio Dulbecco con modificación de Iscove) que comprende 10% de FBS, 10% de suero equino e hidrocortisona; M199 que comprende 10% de FBS, EGF y heparina; α -MEM (medio esencial mínimo) que comprende 10% de FBS, GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende 10% de FBS, GLUTAMAX™ y gentamicina, etc. Un medio preferido es DMEM-LG/MCDB-201 que comprende 2% de FBS, ITS, LA+BSA, dextrosa, L-ácido ascórbico, PDGF, EGF y penicilina/estreptomina.

Otros medios que pueden utilizarse para cultivar las OPAC incluyen DMEM (alta o baja glucosa), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio Dulbecco con modificación de Iscove, Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO LIBRE.

El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferiblemente aproximadamente 2-15% (p/p); suero equino (de caballo) (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferiblemente aproximadamente 0,001% (p/p); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antimicrobianos y/o antibióticos para controlar la contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, penicilina G, estreptomina sulfato, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea solos o en combinación.

Las OPAC pueden cultivarse en condiciones de cultivo tisular estándar, por ejemplo, en platos o placas de múltiples pocillos para cultivo tisular. Las OPAC también pueden cultivarse utilizando un método de gota colgante. En este método, las OPAC se suspenden a aproximadamente 1×10^4 de células por mL en aproximadamente 5 mL de medio y una o más gotas del medio se colocan en el interior de la tapa de un recipiente para cultivo tisular, por ejemplo, una placa de Petri de 100 mL. Las gotas pueden ser, por ejemplo, gotas solas o gotas múltiples de, por ejemplo, una pipeta multicanal. La tapa se invierte cuidadosamente y se coloca sobre el fondo del plato, que contiene un volumen de líquido, por ejemplo, PBS estéril suficiente para mantener el contenido de humedad en la atmósfera del plato, y las células se cultivan.

5.1.3.2 Expansión y proliferación de las OPAC

Una vez que se obtiene una OPAC aislada o población de OPAC aisladas (por ejemplo, una OPAC o población de OPAC separada de al menos aproximadamente 50% de las células coriónicas con las cuales una OPAC o población de OPAC se asocia normalmente in vivo), la OPAC o población de OPAC puede proliferarse y expandirse in vitro. Por ejemplo, una población de OPAC puede cultivarse en recipientes para cultivo tisular, por ejemplo, platos, matraces, placas de múltiples pocillos o similares, durante un tiempo suficiente para que las células proliferen hasta un 70-90% de confluencia, es decir, hasta que las células y su progenie ocupen el 70-90% del área superficial de cultivo del recipiente para cultivo tisular.

Las OPAC pueden sembrarse en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento de células. Por ejemplo, las células pueden sembrarse desde una densidad baja (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 células/cm²) a una densidad alta (por ejemplo, aproximadamente 50.000 o más células/cm²). En un aspecto preferido, las células se cultivan desde aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento por volumen de CO₂ en el aire. En algunos ejemplos preferidos, las células se cultivan de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O₂ en el aire, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento de O₂ en el aire. Las células se cultivan preferiblemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente 37°C. Las células preferiblemente se cultivan en una incubadora. El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, utilizando un biorreactor. Las OPAC preferiblemente se cultivan con estrés oxidativo bajo (por ejemplo, con adición de glutatona, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína o similares).

Una vez que se obtiene una confluencia de 70%-90%, las células se pueden pasar. Por ejemplo, las células pueden tratarse enzimáticamente, por ejemplo, tripsinizarte utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, para separarlas de la superficie de cultivo tisular. Después de retirar las células mediante pipeteado y conteo de células, aproximadamente 20.000-100.000 células, preferiblemente 50.000 células, se pasan a un nuevo recipiente para cultivo que contiene un medio de cultivo nuevo. Típicamente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del cual las células se retiraron. En la presente se proporcionan poblaciones de células placentarias que se han pasado al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces o más.

5.1.3.3 Poblaciones de OPAC

Adicionalmente se divulgan aquí poblaciones de OPAC, las OPAC pueden aislarse directamente de coriones de una o más placentas. Las OPAC aisladas para uso de acuerdo con la invención también pueden cultivarse y expandirse

para producir poblaciones de OPAC. Las poblaciones de células coriónicas que comprenden OPAC también pueden cultivarse y expandirse para producir poblaciones de OPAC.

Las poblaciones de OPAC comprenden OPAC, por ejemplo, las OPAC según se describe en la presente. En varias realizaciones, al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las células en una población de células aisladas son OPAC. Es decir, una población de OPAC puede comprender, por ejemplo, tanto como 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de células no OPAC.

En la presente se divulgan métodos para producir poblaciones aisladas de OPAC mediante, por ejemplo, la selección de células de corion que expresan marcadores particulares y/o características de cultivo o morfológicas particulares. Además se divulga en la presente un método para producir una población de células que comprende seleccionar células coriónicas que se adhieren a un sustrato y expresan CD105 pero no expresan CD200; y aislar dichas células de otras células coriónicas para formar una población de células, por ejemplo, una población de OPAC. En una realización específica, las células coriónicas CD105⁺, CD200⁻ que también son NG2⁺, osteoprotegerina⁺, negativas para alfa actina de músculo liso y/o exhiben actividad de fosfatasa alcalina inducible, están aisladas de otras células coriónicas.

En las realizaciones anteriores, el sustrato puede ser cualquier superficie en la cual pueda lograrse el cultivo y/o la selección de células, por ejemplo, OPAC. Típicamente, el sustrato es plástico, por ejemplo, plástico para plato o placa de múltiples pocillos para cultivo tisular. El plástico para cultivo tisular puede recubrirse con una biomolécula, por ejemplo, laminina, vitronectina, colágeno o fibronectina.

Las OPAC y poblaciones de OPAC pueden seleccionarse mediante cualquier medio conocido en la técnica de selección celular. Por ejemplo, las células pueden seleccionarse utilizando un anticuerpo o anticuerpos para uno o más marcadores de la superficie celular, por ejemplo, en citometría de flujo o FACS. La selección puede lograrse utilizando anticuerpos en conjunto con perlas magnéticas. Los anticuerpos que son específicos para determinados marcadores relacionados con las células madre son conocidos en la técnica. Por ejemplo, CD200 (Abeam) o CD105 (Abeam; BioDesign International, Saco, ME), etc. pueden utilizarse para seleccionar las OPAC o poblaciones de OPAC.

Las poblaciones de OPAC pueden comprender células coriónicas que no son OPAC o células que no son células coriónicas ni OPAC.

Las poblaciones de OPAC aisladas pueden combinarse con una o más poblaciones de células no OPAC o células no coriónicas. Por ejemplo, una población aislada de OPAC puede combinarse con sangre (por ejemplo, sangre placentaria o sangre del cordón umbilical), células madre derivadas de sangre (por ejemplo, células madre derivadas de sangre placentaria o sangre del cordón umbilical), poblaciones de células nucleadas derivadas de sangre, células mesenquimales derivadas de médula ósea, poblaciones de células madre derivadas de hueso, médula ósea bruta, células madre adultas (somáticas), poblaciones de células madre contenidas dentro del tejido, células madre cultivadas, poblaciones de células completamente diferenciadas (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células de músculo, células cardíacas, etc.) y similares. Las células en una población de OPAC aislada pueden combinarse con una pluralidad de células de otro tipo en relaciones de aproximadamente 100.000.000:1, 50.000.000:1, 20.000.000:1, 10.000.000:1, 5.000.000:1, 2.000.000:1, 1.000.000:1, 500.000:1, 200.000:1, 100.000:1, 50.000:1, 20.000:1, 10.000:1, 5.000:1, 2.000:1, 1.000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:5.000; 1:10.000; 1:20.000; 1:50.000; 1:100.000; 1:500.000; 1:1.000.000; 1:2.000.000; 1:5.000.000; 1:10.000.000; 1:20.000.000; 1:50.000.000 o aproximadamente 1:100.000.000, comparando los números de células nucleadas totales en cada población. Las células en una población de OPAC aislada también pueden combinarse con una pluralidad de células de una pluralidad de tipos de células.

Una población aislada de OPAC se combina con una pluralidad de células madre hematopoyéticas. Dichas células madre hematopoyéticas pueden, por ejemplo, estar contenidas dentro de sangre placentaria no procesada, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en células nucleadas totales de sangre placentaria, sangre de cordón umbilical o sangre periférica; en una población aislada de células CD34⁺ de sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en médula ósea no procesada; en células nucleadas totales de médula ósea; en una población aislada de células CD34⁺ de médula ósea o similares.

5.1.4 Combinaciones de OPAC y perfusado placentario o células de perfusado placentario

En la presente se divulgan combinaciones de perfusado placentario con células de perfusado placentario aisladas y/o las OPAC. En un aspecto, por ejemplo, un volumen de perfusado placentario es complementado con una pluralidad de células de perfusado placentario y/o una pluralidad de OPAC. En aspectos específicos, por ejemplo, cada milímetro de perfusado placentario se complementa con aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 o más células de perfusado placentario u OPAC. En otro aspecto, una pluralidad de células de perfusado placentario se complementa con un perfusado placentario y/o OPAC. En otro aspecto, una pluralidad de OPAC se complementa con un perfusado placentario y/o una pluralidad de células de perfusado placentario. En ciertas realizaciones, cuando el perfusado se utiliza para la complementación, el volumen del perfusado es

aproximadamente, mayor que aproximadamente o menor que aproximadamente 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del volumen total de células (en solución) más perfusado. Cuando las células de perfusado placentario se utilizan para complementar una pluralidad de OPAC, las células de perfusado placentario generalmente comprenden aproximadamente, más que aproximadamente o menos que aproximadamente 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del número total de células de perfusado placentario más OPAC. De manera similar, cuando las OPAC se utilizan para complementar una pluralidad de células de perfusado placentario, las OPAC generalmente comprenden aproximadamente, más que aproximadamente o menos que aproximadamente 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del número total de células de perfusado placentario más OPAC. Cuando las OPAC o células de perfusado placentario se utilizan para complementar el perfusado placentario, el volumen de solución (por ejemplo, solución salina, medio de cultivo o similar) en el cual las células se suspenden comprende aproximadamente, más que aproximadamente o menos que aproximadamente 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del volumen total de perfusado más células, donde las OPAC se suspenden a aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células por milímetro antes de la complementación.

En la presente adicionalmente se divulga un perfusado placentario agrupado que se obtiene de dos o más fuentes, por ejemplo, dos o más placentas, y se combina, por ejemplo, agrupa. Dicho perfusado agrupado puede comprender volúmenes aproximadamente iguales de perfusado de cada fuente o puede comprender volúmenes diferentes de cada fuente. Los volúmenes relativos de cada fuente pueden seleccionarse de manera aleatoria o pueden basarse, por ejemplo, en una concentración o cantidad de uno o más factores celulares, por ejemplo, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas o similares; el número de células placentarias en perfusado de cada fuente u otra característica de perfusado de cada fuente. El perfusado de perfusiones múltiples de la misma placenta puede estar, de manera similar, agrupado.

De manera similar, células de perfusado placentario y OPAC se obtienen de dos o más fuentes, por ejemplo, dos o más placentas y/o coriones, y se agrupan. Dichas células agrupadas pueden comprender cantidades aproximadamente iguales de células de dos o más fuentes o cantidades diferentes de células de una o más de las fuentes agrupadas. Las cantidades relativas de células de cada fuente pueden seleccionarse en base, por ejemplo, a la cantidad de uno o más tipos de células específicos en las células a agrupar, por ejemplo, la cantidad de células madre CD34, etc.

Los grupos pueden comprender, por ejemplo, perfusado placentario complementado con células de perfusado placentario; perfusado placentario complementado con OPAC; perfusado placentario complementado con células de perfusado placentario y OPAC; células de perfusado placentario complementadas con perfusado placentario; células de perfusado placentario complementadas con OPAC; células de perfusado placentario complementadas con perfusado placentario y OPAC; OPAC complementadas con perfusado placentario; OPAC complementadas con células de perfusado placentario o OPAC complementadas con células de perfusado placentario y perfusado placentario.

En algunos aspectos, el perfusado placentario, las células de perfusado placentario y las OPAC se divulgan como unidades administrables de grado farmacéutico. Dichas unidades pueden estar en volúmenes discretos, por ejemplo, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL, 500 mL o similar. Dichas unidades pueden contener un número especificado de, por ejemplo, células de perfusado placentario, células destructoras naturales intermedias derivadas de perfusado placentario o ambas, por ejemplo 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células por milímetro o 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células por unidad. Dichas unidades pueden contener cantidades especificadas de cualesquiera dos o los tres de perfusado placentario, células de perfusado placentario y/o OPAC.

En las combinaciones anteriores de perfusado placentario, las células de perfusado placentario y/o OPAC, cualquiera, cualesquiera dos o los tres de perfusado placentario, células de perfusado placentario y/o OPAC pueden ser autólogos con respecto a un receptor (es decir, se obtienen del receptor) u homólogos con respecto a un receptor (es decir, se obtienen de al menos otro individuo distinto de dicho receptor).

En la presente también se divulgan composiciones que comprenden OPAC en combinación con células de perfusado placentario y/o perfusado placentario. Por lo tanto, en otro aspecto, en la presente se divulga una composición que comprende OPAC aisladas, en donde dichas células madre placentarias se aíslan del perfusado placentario y en donde dichas OPAC comprenden al menos 50% de las células en la composición. Dichas OPAC comprenden al menos 80% de las células en la composición. Específicamente, la composición comprende un perfusado placentario aislado. Más específicamente, dicho perfusado placentario es del mismo individuo que dichas OPAC. Más específicamente, dicho perfusado placentario comprende un perfusado placentario de un individuo diferente que dichas OPAC. La composición puede comprender células de perfusado placentario. Dichas células de perfusado placentario pueden ser del mismo individuo que dichas OPAC. Alternativamente, dichas células de perfusado placentario pueden ser de un individuo diferente que dichas OPAC. Específicamente, la composición adicionalmente comprende un perfusado placentario aislado y células de perfusado placentario aislado, en donde dicho perfusado aislado y dichas células de perfusado placentario aislado son de diferentes individuos. Más

específicamente, dicho perfusado placentario comprende perfusado placentario de al menos dos individuos. Adicionalmente, dichas células de perfusado placentario son de al menos dos individuos.

5.1.5 Producción de un banco de células OPAC

5 Las OPAC de corion postparto pueden cultivarse en una cantidad de diferentes maneras para producir un conjunto de lotes, por ejemplo, un conjunto de dosis administradas individualmente. Los conjuntos de lotes de OPAC obtenidos de una pluralidad de coriones pueden disponerse en un banco de OPAC para, por ejemplo, un almacenamiento a largo plazo. Generalmente, las OPAC se obtienen de un cultivo inicial de material coriónico para formar un cultivo seminal, que se expande en condiciones controladas para formar poblaciones a partir de células de números aproximadamente equivalentes de duplicaciones. Los lotes preferiblemente se derivan del tejido coriónico de una sola placenta, pero pueden derivarse del tejido de una pluralidad de placentas.

10 En un aspecto, los lotes de OPAC se obtienen de la siguiente forma. El tejido coriónico primero se altera, por ejemplo, picando, y digiere con una enzima adecuada, por ejemplo, dispasa o dispasa y colágeno (ver la Sección 5.2.3 precedente). El tejido coriónico preferiblemente comprende, por ejemplo, el corion entero de una sola placenta, pero puede comprender sólo una parte del corion. El tejido digerido se cultiva, por ejemplo, durante 15 aproximadamente 1-3 semanas, preferiblemente aproximadamente 2 semanas. Después de retirar las células no adherentes, las colonias de alta densidad que se forman se recogen, por ejemplo, mediante tripsinización. Las células se recogen y resuspenden en un volumen conveniente de medio de cultivo y se definen como células de Pase 0.

20 Las células de Pase 0 se utilizan entonces para sembrar cultivos de expansión. Los cultivos de expansión pueden ser cualquier arreglo de aparatos de cultivo celular separados, por ejemplo, una Fábrica de Células de NUNC™. Las células en el cultivo de Pase 0 pueden subdividirse en cualquier grado para sembrar cultivos de expansión con, por ejemplo, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 o 10×10^4 células. Preferiblemente, se utilizan de aproximadamente 2×10^4 a aproximadamente 3×10^4 de células de Pase 0 para sembrar dicho cultivo de expansión. El número de 25 cultivos de expansión puede depender del número de células de Pase 0 y puede ser mayor o menor en número, dependiendo del corion particular del cual se obtienen las OPAC.

Los cultivos de expansión se cultivan hasta que la densidad de las células en el cultivo alcanza un valor determinado, por ejemplo, aproximadamente 1×10^5 de células/cm². Las células pueden recogerse y criopreservarse en este momento o pasarse para formar nuevos cultivos de expansión según se describió anteriormente. Las células 30 pueden pasarse, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 1, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces antes de su uso. Preferiblemente se mantiene un registro del número acumulativo de duplicaciones de poblaciones durante el cultivo de expansión. Las células de un cultivo de Pase 0 pueden expandirse para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 duplicaciones o hasta 60 duplicaciones. Sin embargo, preferiblemente, el número de duplicaciones de poblaciones, antes de dividir la población de células en dosis individuales, es de entre 35 aproximadamente 15 y aproximadamente 30, preferiblemente aproximadamente 20 duplicaciones. Las células pueden cultivarse continuamente a lo largo del proceso de expansión o pueden congelarse en uno o más puntos durante la expansión.

Las células a utilizar para las dosis individuales pueden congelarse, por ejemplo, criopreservarse para su uso posterior. Las dosis individuales pueden comprender, por ejemplo, de aproximadamente 1 millón a 40 aproximadamente 100 millones de células por ml, y pueden comprender de entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^9 de células en total.

Las células de Pase 0 se cultivan para aproximadamente 4 duplicaciones y luego se congelan en un primer banco de células. Las células del primer banco de células se congelan y se utilizan para sembrar un segundo banco de células, cuyas células se expanden para aproximadamente otras ocho duplicaciones. Las células en esta etapa se 45 recogen y congelan y se utilizan para sembrar nuevos cultivos de expansión que se dejan desarrollar para aproximadamente ocho duplicaciones adicionales, acercando el número acumulativo de duplicaciones celulares a aproximadamente 20. Las células en los puntos intermedios de los pases pueden congelarse en unidades de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 10 millones de células por ml, preferiblemente aproximadamente 1 millón de células por ml, para su uso en un cultivo de expansión posterior. Las células en aproximadamente 20 50 duplicaciones pueden congelarse en dosis individuales de entre aproximadamente 1 millón y aproximadamente 100 millones de células por ml para la administración o el uso para preparar una composición que contiene OPAC.

En un aspecto preferido, el donante del cual se obtiene la placenta (por ejemplo, la madre) se evalúa para detectar al menos un patógeno. Si las pruebas de la madre resultan positivas para un patógeno evaluado, el lote completo de la placenta se descarta. Dicha evaluación puede realizarse en cualquier momento durante la producción de lotes de células OPAC, incluyendo antes o después de establecer las células de Paso 0 o durante el cultivo de expansión. 55 Los patógenos para los cuales la presencia se evalúa pueden incluir, a modo no taxativo, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, virus de inmunodeficiencia humana (tipos I y II), citomegalovirus, herpesvirus y similares.

5.1.6 Diferenciación de las OPAC

Las OPAC pueden inducirse para diferenciarse, por ejemplo, por una vía osteogénica. La diferenciación osteogénica de las OPAC puede inducirse, por ejemplo, colocando las OPAC en condiciones de cultivo de células que inducen la diferenciación en las células osteogénicas. Un medio osteocítico preferido comprende MSCGM (Cambrex) o DMEM complementado con 15% de suero de sangre de cordón, seguido por un Medio de inducción osteogénico (Cambrex) que contiene 0,1 μM de dexametasona, 0,05 mM de ácido ascórbico-2-fosfato, 10 mM de beta glicerofosfato. En otra realización, las OPAC para uso de acuerdo con la invención se cultivan en un medio (por ejemplo, DMEM de baja glucosa) que contiene de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-9} M de dexametasona, aproximadamente 10-50 μM de sal de ascorbato fosfato (por ejemplo, ascorbato-2-fosfato) y aproximadamente 10 nM a aproximadamente 10 mM de β -glicerofosfato. El medio osteogénico también puede incluir suero, uno o más agentes antibióticos/antimicóticos, factor de transformación de crecimiento beta (por ejemplo, TGF- β 1) y/o proteína morfogénica ósea (por ejemplo, BMP-2, BMP-4 o una combinación de las mismas).

La diferenciación puede ensayarse utilizando una tinción específica de calcio, por ejemplo tinción de von Kossa y detección por RT/PCR de, por ejemplo, fosfatasa alcalina, osteocalcina, sialoproteína ósea y/o expresión del gen de la osteopontina.

5.1.7 Preservación de las OPAC

Las OPAC pueden preservarse, es decir, colocarse en condiciones que permitan un almacenamiento a largo plazo o condiciones que inhiban la muerte celular por, por ejemplo, apoptosis o necrosis.

Las OPAC pueden preservarse utilizando, por ejemplo, una composición que comprende un inhibidor de la apoptosis, inhibidor de necrosis y/o un perfluorocarbono portador de oxígeno, según se describe en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos relacionada No. 60/754.969, titulada "Medio mejorado para recolectar células madre placentarias y preservar órganos", presentada el 25 de diciembre de 2005. Un método para preservar una población de OPAC comprende poner en contacto dicha población de OPAC con una composición de recolección de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono portador de oxígeno, en donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir o prevenir apoptosis en la población de las OPAC, en comparación con una población de OPAC que no está en contacto con el inhibidor de la apoptosis. Dicho inhibidor de la apoptosis puede ser un inhibidor de caspasa, o ser un inhibidor de JNK. Más específicamente, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación o proliferación de dichas OPAC. En otro aspecto, dicha composición de recolección de células comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en fases separadas. En otro aspecto, dicha composición de recolección de células comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en una emulsión. En otro aspecto, la composición de recolección de células adicionalmente comprende un emulsionante, por ejemplo, lecitina. En otro aspecto, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 25°C al momento de ponerse en contacto con las OPAC. En otro aspecto más específico, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 2°C y 10°C o entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 5°C al momento de ponerse en contacto con las OPAC. En otro aspecto más específico, dicho contacto se realiza durante el transporte de dicha población de OPAC. En otro aspecto más específico, dicho contacto se realiza durante el congelado y descongelado de dicha población de OPAC.

En otro aspecto, en la presente se divulga un método para preservar una población de OPAC que comprende poner en contacto dicha población de OPAC con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto que preserve los órganos, en donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir o prevenir apoptosis en la población de las OPAC, en comparación con una población de OPAC que no está en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, el compuesto que preserva los órganos es una solución UW (descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 4.798.824; también conocida como ViaSpan; ver también Southard et al., *Transplantation* 49(2):251-257 (1990)) o una solución descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 5.552.267. En otro aspecto, dicho compuesto que preserva los órganos es hidroxietil almidón, ácido lactobiónico, rafinosa o una combinación de los mismos. En otro aspecto, la composición de recolección de células adicionalmente comprende un perfluorocarbono portador de oxígeno, ya sea en dos fases o como una emulsión.

En otro aspecto del método, las OPAC están en contacto con una composición de recolección de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y perfluorocarbono portador de oxígeno, compuesto que preserva los órganos o una combinación de los mismos, durante la perfusión. En otro aspecto, dichas OPAC están en contacto durante un proceso de alteración de tejido, por ejemplo, digestión enzimática. En otro aspecto, las OPAC están en contacto con dicho compuesto de recolección de células después de la recolección por perfusión o después de la recolección por alteración de tejido, por ejemplo, digestión enzimática.

Típicamente, durante la recolección, enriquecimiento y aislamiento de las células, es preferible minimizar o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y estrés mecánico. Por lo tanto, las OPAC están expuestas a una condición hipóxica durante la recolección, enriquecimiento o aislamiento por menos de seis horas durante dicha preservación, en donde una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración normal de oxígeno en la sangre. Más específicamente, dichas OPAC están expuestas a dicha condición hipóxica durante

menos de dos horas durante dicha preservación. Más específicamente, las OPAC se exponen a dicha condición hipóxica durante menos de una hora o menos de treinta minutos o no se exponen a una condición hipóxica, durante la recolección, enriquecimiento o aislamiento. En otro aspecto específico, dichas OPAC no se exponen a un estrés cortante durante la recolección, enriquecimiento o aislamiento.

- 5 Las OPAC para uso de acuerdo con la invención pueden criopreservarse, por ejemplo, en un medio de criopreservación en recipientes pequeños, por ejemplo, ampollas. El medio de criopreservación adecuado incluye, a modo no taxativo, un medio de cultivo que incluye, por ejemplo, un medio de crecimiento o medio de congelamiento de células, por ejemplo un medio de congelamiento de células comercialmente disponible, por ejemplo, C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de criopreservación preferiblemente comprende DMSO (dimetilsulfóxido), a una
10 concentración de, por ejemplo, aproximadamente 10% (v/v). El medio de criopreservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las OPAC preferiblemente se enfrían a aproximadamente 1°C/min durante la criopreservación. Una temperatura de criopreservación preferida es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, preferiblemente de aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C. Las células criopreservadas pueden transferirse a nitrógeno líquido previo a
15 descongelarlas para su uso. Por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células criopreservadas preferiblemente se descongelan a una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37°C.

5.1.8 Composiciones que comprenden OPAC

- 20 En la presente se divulgan composiciones que comprenden OPAC o biomoléculas de las mismas. Las OPAC pueden combinarse con cualquier compuesto, composición o dispositivo fisiológicamente aceptable o médicamente aceptable, para su uso en, por ejemplo, investigación o tratamiento médico.

5.1.8.1 OPAC criopreservadas

- 25 Las poblaciones de OPAC pueden preservarse, por ejemplo, criopreservarse para un uso posterior. Los métodos para la criopreservación de células, tales como las OPAC, son bien conocidos en la técnica. Las poblaciones de OPAC pueden prepararse en una forma que es fácilmente administrable a un individuo. Por ejemplo, una población de OPAC contenida dentro de un recipiente es adecuada para su uso médico. Dicho recipiente puede ser, por ejemplo, una bolsa plástica estéril, matraz, frasco u otro recipiente del cual puede dispensarse fácilmente la población de OPAC. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa plástica médicamente
30 aceptable adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El recipiente es preferiblemente uno que permite la criopreservación de la población de células combinadas.

La población de OPAC criopreservada puede comprender OPAC derivadas de un único donante o de múltiples donantes. La población de OPAC puede ser completamente compatible en HLA para un receptor deseado o parcialmente o completamente incompatible en HLA.

- 35 Por lo tanto, en un aspecto, en la presente se divulga una composición que comprende una población de OPAC en un receptor. Específicamente, la población se criopreserva. Alternativamente, el recipiente es una bolsa, matraz o frasco. Más específicamente, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. Más específicamente, dicha bolsa permite, facilita o es adecuada para la administración intravenosa de una población de OPAC. La bolsa puede comprender múltiples lúmenes o compartimentos que están interconectados para permitir el mezclado de las OPAC y una o más
40 soluciones distintas, por ejemplo, un fármaco, antes o durante la administración. Específicamente, la composición comprende uno o más compuestos que facilitan la criopreservación de la población de células. Además, dicha población de OPAC está contenida dentro de una solución acuosa fisiológicamente aceptable. Dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable puede ser una solución de NaCl al 0,9%. Dicha población de OPAC comprende células placentarias que son compatibles en HLA para un receptor de dicha población, o comprende células que son
45 al menos parcialmente incompatibles en HLA para un receptor de dicha población. Dichas OPAC pueden proceder de una pluralidad de donantes.

5.1.8.2 Composiciones farmacéuticas

- Las poblaciones de OPAC, o poblaciones de células que comprenden OPAC, pueden formularse en composiciones farmacéuticas para utilizar in vivo. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden una población de OPAC, o una
50 población de células que comprende OPAC, en un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable para administración in vivo. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender cualquiera de las poblaciones de OPAC descritas en cualquier otra parte en la presente. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender OPAC fetales, maternas o tanto fetales como maternas. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente pueden comprender además OPAC obtenidas de un
55 solo individuo o corion o de una pluralidad de individuos o coriones.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender cualquier número terapéuticamente útil de OPAC. Por ejemplo, una única dosis de OPAC puede comprender, en varias realizaciones, aproximadamente, al menos o a lo

sumo 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más OPAC.

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

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más compuestos que, por ejemplo, facilitan la inserción (por ejemplo, anticuerpos del receptor anti-células T, un inmunosupresor o similar); estabilizadores tales como albúmina, dextrano 40, gelatina, almidón de hidroxietilo y similares.
10

5.1.8.3 Medios acondicionados con OPAC

Las OPAC para uso de acuerdo con la invención pueden utilizarse para producir un medio acondicionado, es decir, un medio que comprende una o más biomoléculas secretadas o excretadas por las células. En varios aspectos, el medio acondicionado comprende un medio en el cual las OPAC han crecido durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
15 10, 11, 12, 13, 14 o más días. En otros aspectos, el medio acondicionado comprende un medio en el que las OPAC han crecido hasta al menos aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de confluencia o hasta 100% de confluencia. Dicho medio acondicionado puede utilizarse como soporte del cultivo de una población separada de OPAC o células madre de otro tipo. En otro aspecto, el medio acondicionado comprende un medio en el que las OPAC se han diferenciado en un tipo de célula diferenciado terminalmente o una célula que tiene una o más características de una célula terminalmente diferenciada. En otro aspecto, el medio acondicionado comprende un medio en el que las OPAC y no OPAC se han cultivado.
20

5.1.8.4 Matrices que comprenden OPAC

Se proporcionan también en la presente matrices, hidrogeles, andamios y similares que comprenden dichas OPAC. En ciertas realizaciones, la matriz puede ser cualquier sustrato conocido por los expertos en la técnica útil para tratar los defectos óseos. Por ejemplo, la matriz puede ser un sustrato de β -fosfato tricálcico, un sustrato de β -fosfato tricálcico-colágeno, un sustrato de colágeno, un sustrato de fosfato de calcio, un sustrato de colágeno mineralizado y un sustrato de ácido hialurónico. En algunas realizaciones, el colágeno en la matriz puede ser colágeno placentario. Los métodos y composiciones para aislar y preparar colágeno placentario se describen exhaustivamente, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente No. 2007/0020225.
25

Las OPAC pueden sembrarse en la matriz para tratar los huesos antes o después de una etapa de diferenciación. Por ejemplo, las OPAC pueden cultivarse en, por ejemplo, un medio osteogénico durante, por ejemplo, aproximadamente 1-20 días, y luego se siembran en la matriz. Alternativamente, las OPAC pueden aislarse y sembrarse en la matriz, luego cultivarse en un medio osteogénico tal como se describe en la presente durante, por ejemplo, aproximadamente 1-20 días. En otra realización, las OPAC se cultivan en, por ejemplo, un medio osteogénico durante, por ejemplo, aproximadamente 1-20 días, luego se siembran en la matriz, se cultivan en un medio osteogénico tal como se describe en la presente durante, por ejemplo, aproximadamente 1-20 días.
30 35

Las OPAC pueden sembrarse en una matriz natural, por ejemplo, biomaterial placentario tal como un material de membrana amniótica. Dicho material de membrana amniótica puede ser, por ejemplo, membrana amniótica disecada directamente de una placenta de mamífero; membrana amniótica fijada o tratada con calor, membrana amniótica básicamente seca (es decir, $<20\%$ de H_2O), membrana coriónica, membrana coriónica básicamente seca, membrana amniótica básicamente seca y membrana coriónica, y similares. Biomateriales placentarios preferidos en los cuales pueden sembrarse las OPAC se describen en Hariri, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2004/0048796.
40

Las OPAC pueden suspenderse en una solución de hidrogel adecuada para, por ejemplo, inyección. Hidrogeles adecuados para dichas composiciones incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD 16. En una realización, una solución de hidrogel que comprende las células puede dejarse endurecer, por ejemplo, en un molde, para formar una matriz que tiene células dispersas en la misma para implantación. Las OPAC en dicha matriz también pueden cultivarse de forma tal que las células se expandan mediante mitosis antes de la implantación. El hidrogel es, por ejemplo, un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura abierta tridimensional que atrapa las moléculas de agua para formar un gel. Materiales de formación de hidrogeles incluyen polisacáridos tales como alginato y sales de los mismos, péptidos, polifosfazinas y poliácridatos, que se reticulan iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de óxido de polietileno-propilenglicol, que se reticulan por temperatura o pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o matriz es biodegradable.
45 50

En algunas realizaciones, la formulación comprende un gel polimerizable in situ (ver, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2002/0022676; Anseth et al, J. Control Release, 78(1-3): 199-209 (2002); Wang et al., Biomaterials, 24(22): 3969-80 (2003).
55

- En algunas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas o soluciones de alcohol acuosas, que tienen grupos laterales cargados o una sal iónica monovalente de los mismos. Ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que pueden reaccionar con cationes son poli(fosfazenos), ácido poli(acrílicos), ácidos poli(metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, acetato poli(vinílico) y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. Copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímero de éter vinílico también pueden utilizarse. Ejemplos de grupos ácidos son grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos de alcohol halogenados (preferiblemente fluorados), grupo OH fenólicos y grupos OH ácidos.
- 5 Las OPAC o poblaciones de las mismas pueden sembrarse sobre un marco tridimensional o andamio o implantarse in vivo. Dicho marco puede implantarse en combinación con cualquiera de uno o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que estimulan la formación de tejido o de otro modo potencian o mejoran la reparación del tejido.
- 10 Ejemplos de andamios que pueden utilizarse incluyen esteras no tejidas, espumas porosas o péptidos auto-ensamblados. Las esteras no tejidas pueden formarse usando fibras que comprenden un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólicos y lácticos (por ejemplo, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Espumas, compuestas por, por ejemplo, copolímero de poli(ε-caprolactona)/ácido poli(glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos tales como liofilización (ver, por ejemplo, la Pat. de los Estados Unidos No. 6.355.699), también pueden utilizarse como andamios.
- 15 Las OPAC proporcionadas en la presente también pueden sembrarse en, o ponerse en contacto con, material de cerámica fisiológicamente aceptable incluido, a modo no taxativo, mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri- y tetra-fosfato de calcio, hidroxiapatita, fluoroapatitas, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de calcio de magnesio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS® y mezclas de los mismos. Materiales de cerámica biocompatibles porosos disponibles actualmente en el mercado incluyen SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canadá), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Suiza) y productos de injertos óseos de colágeno mineralizado tales como HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITOSS®, RHAKOSS™ y CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). El marco puede ser una mezcla, combinación o compuesto de materiales naturales y/o sintéticos.
- 20 En otra realización, las OPAC pueden sembrarse en, o ponerse en contacto con, un fieltro, que puede, por ejemplo, estar compuesto por un hilo multifilamento hecho de material bioabsorbible tal como copolímero o combinaciones de PGA, PLA, PCL o ácido hialurónico.
- 25 Las OPAC pueden, en otra realización, sembrarse en andamios de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Dichos andamios de espuma pueden moldearse en una forma útil, tal como la de una porción de una estructura específica en el cuerpo que debe repararse, reemplazarse o aumentarse. En algunos aspectos, el marco se trata, por ejemplo, con 0,1 M de ácido acético mediante incubación en polilisina, PBS y/o colágeno, antes de la inoculación de las OPAC para mejorar la unión celular. Las superficies externas de una matriz pueden modificarse para mejorar la unión o crecimiento de células y la diferenciación de tejido, tal como mediante recubrimiento con plasma de la matriz, o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatán, sulfato de queratina, etc.), una matriz celular y/u otros materiales tales como, a modo no taxativo, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales y similares.
- 30 En otra realización, el andamio comprende, o se trata con, materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y sostener el crecimiento endotelial, migración y deposición de matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, a modo no taxativo, materiales naturales tales como proteínas de membrana base tales como laminina y colágeno Tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE y siliconas de poliuretano urea segmentadas, tales como PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif). El andamio también puede comprender agentes antitrombóticos tales como heparina; los andamios también pueden tratarse para alterar la carga de la superficie (por ejemplo, recubriendo con plasma) antes de sembrar con OPAC. El andamio puede comprender además agentes que estimulan el crecimiento óseo y/o inhiben la resorción ósea. Por ejemplo, el andamio puede comprender proteínas morfogénicas óseas, por ejemplo, BMP-2 y/o BMP-7, inhibidores de WNT y similares.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 5.1.9 Líneas celulares OPAC inmortalizadas
- Las OPAC pueden inmortalizarse de forma acondicionada mediante transfección con cualquier vector adecuado que contiene un gen promotor del crecimiento, es decir, un gen que codifica una proteína que, en las condiciones apropiadas, promueve el crecimiento de la célula transfectada, de forma tal que la producción y/o actividad de la proteína promotora del crecimiento es regulable mediante un factor externo. En un aspecto preferido el gen promotor del crecimiento es un oncogén tal como, a modo no taxativo, v-myc, N-myc, c-myc, p53, antígeno T grande de SV40, antígeno T grande de polioma, adenovirus Ela o proteína E7 de papilomavirus humano.
- 55

La regulación externa de la proteína promotora del crecimiento puede lograrse colocando el gen promotor del crecimiento bajo el control de un promotor externamente regulable, por ejemplo, un promotor cuya actividad puede controlarse mediante, por ejemplo, modificación de la temperatura de las células transfectadas o la composición del medio en contacto con las células. En un aspecto, puede emplearse un sistema de expresión génica controlada por tetraciclina (tet) (ver Gossen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 89:5547-5551, 1992; Hoshimaru et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 93:1518-1523, 1996). En ausencia de la tet, un transactivador controlado por tet (tTA) dentro de este vector activa fuertemente la transcripción de $ph_{CMV^{-1}}$, un promotor mínimo del citomegalovirus humano fusionado con secuencias operadoras tet. La tTA es una proteína de fusión del represor (tetR) del operón de resistencia a tet derivada de transposón-10 de *Escherichia coli* y el dominio ácido de VP16 del virus del herpes simplex. Concentraciones no tóxicas bajas de tet (por ejemplo, 0,01-1,0 $\mu\text{g/mL}$) suprimen casi completamente la transactivación mediante tTA.

El vector contiene además un gen que codifica un marcador seleccionable, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia a los fármacos. El gen de resistencia a la neomicina bacteriana (neo^R) es un marcador tal que puede emplearse como se describe en la presente. Las células que portan neo^R pueden seleccionarse por medios conocidos por los expertos en la técnica, tal como la adición de, por ejemplo, 100-200 $\mu\text{g/mL}$ de G418 al medio de cultivo.

La transfección puede lograrse por cualquiera de una variedad de medios conocidos por los expertos en la técnica que incluyen, a modo no taxativo, la infección retroviral. En general, un cultivo celular puede transfectarse mediante incubación con una mezcla de medio acondicionado recolectada de la línea celular del productor para el vector y DMEM/F12 que contiene complementos de N2. Por ejemplo, un cultivo celular placentario preparado como se describió anteriormente puede infectarse después de, por ejemplo, cinco días in vitro mediante incubación durante aproximadamente 20 horas en un volumen de medio acondicionado y dos volúmenes de DMEM/F12 que contiene complementos de N2. Las células transfectadas que portan un marcador seleccionable pueden seleccionarse entonces tal como se describió anteriormente.

Tras la transfección, los cultivos se pasan sobre una superficie que permite la proliferación, por ejemplo, permite que al menos aproximadamente 30% de las células se dupliquen en un período de 24 horas. Preferiblemente, el sustrato es un sustrato de poliornitina/laminina, que consiste en plástico de cultivo tisular recubierto con poliornitina (10 $\mu\text{g/mL}$) y/o laminina (10 $\mu\text{g/mL}$), un sustrato de polilisina/laminina o un superficie tratada con fibronectina. Los cultivos se alimentan entonces cada 3-4 días con un medio de cultivo, que puede complementarse o no con uno o más factores que mejoran la proliferación. Pueden agregarse al medio de cultivo factores que mejoran la proliferación cuando los cultivos son menos de 50% confluentes.

Las líneas celulares OPAC inmortalizadas de forma acondicionada pueden pasarse usando técnicas estándar, tal como mediante tripsinización, cuando son 80-95% confluentes. Hasta aproximadamente el vigésimo paso, en algunas realizaciones, es beneficioso mantener la selección (mediante, por ejemplo, la adición de G418 para células que contienen un gen de resistencia a la neomicina). Las células también pueden congelarse en nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo.

Las líneas celulares clonales pueden aislarse de una línea celular OPAC humana inmortalizada de forma acondicionada tal como se describió anteriormente. En general, dichas líneas celulares clonales pueden aislarse usando técnicas estándar, tal como mediante dilución o usando anillos de clonación y expandirse. Las líneas celulares clonales pueden alimentarse en general y pasarse tal como se describió anteriormente.

Las líneas celulares OPAC humanas inmortalizadas de forma acondicionada, que pueden ser clonales, pero no necesariamente lo son, pueden inducirse en general para diferenciarse mediante supresión de la producción y/o actividad de la proteína promotora de crecimiento en condiciones que facilitan la diferenciación. Por ejemplo, si el gen que codifica la proteína promotora del crecimiento está bajo el control de un promotor externamente regulable, las condiciones, por ejemplo, temperatura o composición del medio, pueden modificarse para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. Para el sistema de expresión génica controlada por tetraciclina que se describió anteriormente, la diferenciación puede lograrse mediante adición de la tetraciclina para suprimir la transcripción del gen promotor de crecimiento. En general, 1 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina durante 4-5 días es suficiente para iniciar la diferenciación. Para promover una mayor diferenciación, pueden incluirse agentes adicionales en el medio de cultivo.

5.1.10 Ensayos

Las OPAC pueden utilizarse en ensayos para determinar la influencia de las condiciones de cultivo, los factores ambientales, moléculas (por ejemplo, biomoléculas, pequeñas moléculas inorgánicas, etc.) y similares en la proliferación, expansión y/o diferenciación de OPAC, en comparación con las OPAC no expuestas a dichas condiciones.

En una realización preferida, las OPAC se ensayan en busca de cambios en la proliferación, expansión o diferenciación tras el contacto con una molécula. Por ejemplo, la diferenciación osteogénica puede ensayarse monitoreando la actividad de fosfatasa alcalina y/o mineralización de calcio.

Se divulga en la presente un método para identificar un compuesto que modula la proliferación de una pluralidad de OPAC, que comprende poner en contacto dicha pluralidad de OPAC con dicho compuesto en condiciones que permiten la proliferación, en donde si dicho compuesto provoca un cambio detectable en la proliferación de dicha pluralidad de OPAC en comparación con una pluralidad de OPAC que no entran en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto es identificado como un compuesto que modula la proliferación de OPAC. Dicho compuesto puede identificarse como un inhibidor de proliferación o como un potenciador de proliferación.

Además se divulga en la presente un método para identificar un compuesto que modula la expansión de una pluralidad de OPAC, que comprende poner en contacto dicha pluralidad de OPAC con dicho compuesto en condiciones que permiten la expansión, en donde si dicho compuesto provoca un cambio detectable en la expansión de dicha pluralidad de OPAC en comparación con una pluralidad de OPAC que no entra en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto es identificado como un compuesto que modula la expansión de OPAC. Dicho compuesto puede identificarse como un inhibidor de expansión, o como un potenciador de expansión.

Además se divulga en la presente un método para identificar un compuesto que modula la diferenciación de OPAC, que comprende poner en contacto dichas OPAC con dicho compuesto en condiciones que permiten la diferenciación, en donde si dicho compuesto provoca un cambio detectable en la diferenciación de dichas OPAC en comparación con las OPAC que no entran en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto es identificado como un compuesto que modula la proliferación de OPAC. Dicho compuesto se puede identificar como un inhibidor de la proliferación, o como un potenciador de proliferación.

5.2 USOS DE LAS OPAC

5.2.1 Tratamiento de cánceres relacionados con los huesos usando OPAC

Se divulgan en la presente métodos para tratar individuos que tienen cáncer relacionado con los huesos que comprenden administrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de OPAC. Los cánceres relacionados con los huesos incluyen, a modo no taxativo, mieloma múltiple, cáncer óseo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, cordoma, histiocitoma maligno fibroso óseo, fibrosarcoma óseo, cáncer metastásico, mieloma múltiple y cualquier forma de cáncer metastásico caracterizado por metástasis ósea. En algunos aspectos, la administración de OPAC es terapéuticamente efectiva para reducir, mejorar o revertir uno o más síntomas asociados con el cáncer relacionado con los huesos, por ejemplo, un síntoma causado por o relacionado con un efecto del cáncer en uno o más huesos en el individuo. Como lo reconocerá un experto en la técnica, el tratamiento de los defectos óseos causados por cáncer puede no necesariamente abatir el cáncer en sí mismo. El tratamiento de los defectos óseos relacionados con el cáncer tal como los proporcionados en la presente puede ocurrir antes, después o simultáneamente a las terapias adicionales contra el cáncer, tal como se describe más abajo. Por lo tanto, en una realización, los defectos óseos son tratados antes de que el cáncer se trate con una terapia anti-cáncer. En otra realización, los defectos óseos se tratan al mismo tiempo o prácticamente al mismo tiempo en que se trate el cáncer con la terapia anti-cáncer. En otra realización, los defectos óseos se tratan después de que el cáncer se trate con una terapia anti-cáncer.

En algunos aspectos, el tratamiento de cánceres relacionados con los huesos, por ejemplo, mieloma múltiple, comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de OPAC a un individuo que tiene células de cáncer relacionado con los huesos, por ejemplo, células de mieloma múltiple, en donde al menos algunas de dichas OPAC se ponen en contacto directamente con al menos algunas células de mieloma múltiple, por ejemplo, hay un contacto directo célula-célula entre al menos algunas de dichas OPAC y algunas de dichas células de cáncer relacionado con los huesos. En ciertos aspectos, el tratamiento de cánceres relacionados con los huesos, por ejemplo, mieloma múltiple, comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de OPAC a un individuo que tiene células de cáncer relacionado con los huesos, por ejemplo, células de mieloma múltiple, en donde ninguna o básicamente ninguna de dichas OPAC se ponen en contacto directamente con células de mieloma múltiple, por ejemplo, no hay, o básicamente casi no hay, un contacto directo célula-célula entre al menos algunas de dichas OPAC y células de cáncer relacionado con los huesos.

En algunos aspectos, las OPAC se administran intralesionalmente, por ejemplo, directamente en, o adyacente a (por ejemplo, dentro de 1-5 cm de) una o más lesiones causadas por el cáncer. En ciertos aspectos, las OPAC se administran en combinación con una matriz, por ejemplo, una matriz inyectable.

En algunas realizaciones, las OPAC se administran a un individuo que tiene cáncer relacionado con los huesos con una matriz sólida, por ejemplo, un sustituto de matriz, por ejemplo, un sustituto de hueso, una matriz o un sustituto de hueso descrito en la Sección 5.2.2 a continuación.

En ciertas otras realizaciones, las OPAC se administran por vía intravenosa al individuo. Las OPAC pueden administrarse de cualquier recipiente, y mediante cualquier sistema de administración, médicamente adecuado para administración de fluidos, por ejemplo, fluidos que comprenden células, a un individuo. Dichos recipientes pueden ser, por ejemplo, una bolsa de plástico estéril, matraz, frasco u otro recipiente del cual la población de OPAC puede dispensarse fácilmente. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico médicamente aceptable adecuada para administración intravenosa de un líquido a un receptor.

La administración intralesional o intravenosa puede comprender, por ejemplo, aproximadamente, al menos, o más de 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más OPAC en una única dosis. Las OPAC pueden administrarse una vez, o más de una vez, durante el transcurso de la terapia. Preferiblemente, las OPAC administradas comprenden 50% de células viables o más (es decir, al menos aproximadamente 50% de las células en la población son funcionales o están vivas). Preferiblemente, al menos aproximadamente 60% de las células en la población son viables. Más preferiblemente, al menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las células en la población en la composición farmacéutica son viables.

5.2.1.1 Tratamiento de Mieloma Múltiple

Se describen aquí métodos de tratamiento de un individuo que padece mieloma múltiple, que comprende administrar a dicho individuo una pluralidad de OPAC, en donde dichas OPAC tienen cualquier combinación de, o todas, las características descritas en la Sección 5.1, anteriormente. En un aspecto específico, dicha pluralidad de OPAC es CD105⁺ y CD200^{lenué} o CD105⁺ y CD200⁻. Los métodos de tratamiento proporcionados en la presente comprenden el uso de cualquiera de las OPAC, poblaciones de OPAC o poblaciones de células que comprenden OPAC, descritas en la Sección 5.1, anteriormente.

El mieloma múltiple es un cáncer de células de plasma, que son células que producen anticuerpos del sistema inmunitario. La enfermedad normalmente se presenta con cuatro características principales: calcio elevado, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas. Estos síntomas y otros se describen más adelante.

Dolor de huesos - Las células de mieloma secretan IL-6, también conocido como factor activador de osteoclastos (OAF), que es una citoquina que activa los osteoclastos para romper los huesos, creando lesiones óseas dolorosas. Estas lesiones óseas son de naturaleza lítica y son visibles en radiografías, que pueden mostrar lesiones resortivas "perforadas". El dolor en los huesos por mieloma normalmente involucra a la columna y las costillas y empeora con la actividad. Se puede sentir dolor localizado persistente presente y puede indicar una fractura ósea patológica. La implicación de las vértebras puede provocar la compresión de la médula ósea. La rotura de hueso también provoca la liberación de calcio en la sangre, produciendo hipercalcemia y sus síntomas asociados.

Las áreas de rotura de hueso, como se ve en un estudio esquelético, normalmente aparecen como una o más lesiones líticas en el hueso, es decir, regiones en las que el hueso parece ausente o "perforado."

Infección - Otro síntoma común del mieloma múltiple es la infección, en la medida que se altera el sistema inmunitario. El riesgo de infección se debe a la deficiencia inmunitaria que resulta de hipogamaglobulinemia difusa, que se debe a una menor producción o mayor destrucción de anticuerpos normales. Las infecciones más comunes son las neumonías y pielonefritis. Los patógenos de neumonía común que provocan enfermedad en pacientes con mieloma múltiple incluyen *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, mientras que los patógenos comunes que causan pielonefritis incluyen *Escherichia coli*. Normalmente, la infección ocurre en los meses iniciales después del comienzo de la quimioterapia.

Insuficiencia renal - El mieloma múltiple también tiende a resultar en insuficiencia renal, que puede desarrollarse de forma aguda y crónica. La insuficiencia renal en el mieloma múltiple se puede atribuir en gran medida a hipercalcemia, que se desarrolla cuando los osteoclastos desmantelan el hueso existente. La insuficiencia renal también es provocada por daño tubular por la excreción de cadenas livianas, también denominadas proteínas Bence Jones, que puede manifestarse como el síndrome de Fanconi (acidosis tubular renal tipo II). Otras causas incluyen deposición glomerular de amiloide, hiperuricemia, infecciones recurrentes (por ejemplo, pielonefritis) e infiltración local de células tumorosas. La insuficiencia renal puede asociarse con niveles elevados de creatinina en suero.

Anemia - La anemia que se encuentra en el mieloma normalmente es normocítica y normocrómica, y resulta del reemplazo de médula ósea normal por infiltración de células tumorosas y la inhibición de la producción de glóbulos rojos normales (hematopoyesis) mediante citoquinas.

Síntomas neurológicos - Los síntomas de mieloma múltiple incluyen un espectro de afecciones neurológicas, incluidas debilidad, confusión y fatiga debido a dolor de cabeza por hipercalcemia, cambios visuales y retinopatía, que pueden ser el resultado de hiperviscosidad de la sangre dependiendo de las propiedades de la paraproteína (ver más adelante). Otros síntomas neurológicos incluyen dolor radicular, pérdida de control de los intestinos o la vejiga (por ejemplo, debido al involucramiento de la médula espinal que provoca compresión de la médula), y síndrome de túnel carpiano y otras neuropatías (por ejemplo, debido a infiltración de los nervios periféricos por amiloide). El mieloma múltiple puede dar lugar a paraplejía en casos de presentación tardía.

Presencia de paraproteína - Un síntoma de diagnóstico del mieloma múltiple es la presencia en la sangre y/u orina de paraproteína, que es una proteína monoclonal (proteína M), por ejemplo, una cadena liviana de inmunoglobulina que se produce por la proliferación clonal de células de plasma o fragmentos de inmunoglobulina.

El mieloma múltiple sintomático normalmente se diagnostica cuando están presentes los siguientes síntomas o signos: células de plasma clonales que constituyen más del 10% de las células en la biopsia de la médula ósea, en cualquier cantidad en una biopsia de otros tejidos (por ejemplo, plasmacitoma); paraproteína en suero u orina;

pruebas de daño a órganos afectados (alteración del órgano o tejido relacionado), por ejemplo, hipercalcemia (por ejemplo, calcio corregido >2,75 mmol/L en la sangre), insuficiencia renal atribuible a mieloma, anemia definida como hemoglobina <10 g/dL de sangre, lesiones óseas (por ejemplo, lesiones líticas u osteoporosis con fracturas de compresión, infecciones severas frecuentes (>2 por año), amiloidosis (la deposición de proteína amiloide) de otros órganos y síndrome de hiperviscosidad (aumento de la viscosidad de la sangre).

Los individuos que tienen mieloma múltiple entran en uno de los siguientes grupos. En un aspecto, el individuo que padece mieloma múltiple nunca ha sido tratado por la enfermedad. En otro aspecto, el individuo tiene mieloma sensible; es decir, mieloma múltiple que responde a la terapia. En un aspecto específico, dicho individuo exhibe una disminución de la proteína M (paraproteína) de al menos 50% como resultado del tratamiento. En otro aspecto específico, el individuo exhibe una disminución de la proteína M de entre 25% y 50% como resultado del tratamiento. En otro aspecto, el individuo tiene mieloma múltiple estable, que se refiere a mieloma que no ha respondido al tratamiento (por ejemplo, la disminución de la proteína M no llegó a 50%), pero no evolucionó ni empeoró. En otro aspecto, el individuo tiene mieloma múltiple progresivo, que se refiere a mieloma activo que está empeorando (por ejemplo, aumentando la proteína y empeorando la deficiencia del órgano o tejido o daño al órgano afectado). En otro aspecto, el individuo tiene recaída de mieloma múltiple, que se refiere a enfermedad de mieloma que inicialmente respondió a terapia pero comenzó a progresar nuevamente. En un aspecto específico, el individuo ha recaído después de terapia inicial o ha recaído a terapia posterior. En otro aspecto, el individuo tiene mieloma múltiple refractario. En un aspecto específico, el mieloma múltiple refractario es mieloma múltiple que no ha respondido a terapia inicial. En un aspecto específico, el mieloma múltiple refractario es mieloma múltiple que ha recaído que no ha respondido a tratamiento posterior. En otro aspecto específico, el mieloma múltiple refractario es una enfermedad refractaria que no responde al tratamiento, es decir, enfermedad refractaria que está progresando. En otro aspecto específico, el mieloma múltiple refractario es una enfermedad refractaria que no responde al tratamiento y no progresa, es decir, enfermedad refractaria que no empeora.

De esta forma, en la presente se divulga un método para tratar a un individuo que padece mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo OPAC, una población de OPAC o una población de células que comprenden OPAC, en donde dicha administración da como resultado la reducción detectable de la progresión, el cese detectable del empeoramiento y/o la mejora detectable de uno o más síntomas del mieloma múltiple. En aspectos específicos, dicho síntoma o síntomas comprenden calcio en sangre u orina elevada en comparación con lo normal, la presencia de lesiones óseas, anemia o insuficiencia renal. En un aspecto más específico, dicho síntoma o síntomas comprenden células de plasma clonal que constituyen más de 10% de células en la biopsia de médula ósea o en cualquier cantidad en una biopsia de otros tejidos (por ejemplo, plasmacitoma); paraproteína en suero u orina y/o pruebas de daño al órgano afectado. En un aspecto más específico, dicho síntoma o síntomas son una concentración de calcio en la sangre de más de 2,75 mmol/L, insuficiencia renal, menos de 10 g de hemoglobina por decilitro de sangre, la presencia de lesiones óseas o amiloidosis de uno o más órganos que no sea la médula ósea.

En otro aspecto específico, dicho síntoma es un síntoma neurológico. En aspectos más específicos, dichos síntomas neurológicos son debilidad, confusión, fatiga, dolor de cabeza, cambios visuales, retinopatía, dolor radicular, pérdida de control de los intestinos o vejiga, síndrome de túnel carpiano y/o paroplejía.

En un aspecto, en la presente se divulga un método para tratar un individuo que padece mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo OPAC, una población de OPAC o una población de células que comprenden OPAC, en donde dicha administración da como resultado la reducción detectable en el número de células de mieloma múltiple, por ejemplo, células de mieloma múltiple clonales, en uno o más órganos del individuo.

En un aspecto, en la presente se divulga un método para tratar un individuo que padece mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo OPAC, una población de OPAC o una población de células que comprenden OPAC, en donde dicha administración da como resultado el aumento detectable de hemoglobina en la sangre del individuo, por ejemplo, un aumento hasta dentro de los límites normales. Los niveles de hemoglobina normales varían según la edad y el sexo del individuo, tal como se muestra en la Tabla 1, a continuación:

Tabla 1

Recién nacidos	17-22 gm/dl
Una (1) semana de edad	15-20 gm/dl
Un (1) mes de edad	11-15 gm/dl
Niños	11-13 gm/dl
Hombres adultos	14-18 gm/dl
Mujeres adultas	12-16 gm/dl
Hombres después de la edad madura	12,4-14,9 gm/dl

Mujeres después de la edad madura

11,7-13,8 gm/dl

- 5 De esta forma, en la presente se divulga un método para tratar un individuo que padece mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo OPAC, una población de OPAC o una población de células que comprenden OPAC, en donde dicha administración da como resultado el aumento de niveles de hemoglobina en sangre en dicho individuo hasta entre 11 g/dL de sangre y 20 g/dL de sangre. En un aspecto más específico, dicha administración da como resultado el aumento de los niveles de hemoglobina en sangre en dicho individuo hasta entre 11 g/dL de sangre y 13 g/dL de sangre. En otro aspecto más específico, dicha administración da como resultado el aumento de los niveles de hemoglobina en sangre en dicho individuo hasta entre 12 g/dL de sangre y 16 g/dL de sangre. En otro aspecto más específico, dicha administración da como resultado el aumento de los niveles de hemoglobina en sangre en dicho individuo hasta entre 14 g/dL de sangre y 18 g /dL de sangre.
- 10 En otro aspecto, en la presente se divulga un método para tratar un individuo que padece mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo OPAC, una población de OPAC o una población de células que comprenden OPAC, en donde dicha administración da como resultado una reducción detectable del nivel de paraproteína en sangre u orina de dicho individuo. En un aspecto específico, dicha administración da como resultado la reducción de la paraproteína en sangre u orina de dicho individuo hasta un nivel no detectable.
- 15 En otro aspecto, en la presente se divulga un método para tratar un individuo que padece mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo OPAC, una población de OPAC o una población de células que comprenden OPAC, en donde dicha administración da como resultado una reducción detectable de la gravedad y/o el número de lesiones óseas causadas por mieloma múltiple en dicho individuo, tal como se determina, por ejemplo, por escaneo de huesos o radiografía. En otro aspecto, en la presente se divulga un método para tratar un individuo que padece
- 20 mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo OPAC, una población de OPAC o un población de células que comprende OPAC, en donde dicha administración da como resultado una reducción detectable de la pérdida de masa ósea o contenido mineral óseo, cese de pérdida de masa ósea o contenido mineral óseo, o aumento de la masa ósea o contenido mineral óseo, en dicho individuo.
- 25 Dicho uno o más síntomas de mieloma múltiple son dolor en los huesos, lesiones osteocíticas (por ejemplo, visibles mediante rayos X o formación de imágenes por resonancia magnética (MRI)), osteoporosis, anemia, hipercalcemia o un síntoma debido a hipercalcemia o insuficiencia renal. En otros aspectos, dicho individuo nunca ha sido tratado por mieloma múltiple; dicho individuo ha sido tratado por mieloma múltiple y responde a terapia sin OPAC; dicho individuo ha sido tratado contra mieloma múltiple y no ha respondido a terapia sin OPAC, pero el mieloma múltiple en dicho individuo no ha progresado; o dicho individuo tiene mieloma múltiple.
- 30 En otro aspecto, se divulga en la presente un método para suprimir la proliferación de células de mieloma múltiple, que comprende poner en contacto dichas células de mieloma múltiple con una pluralidad de OPAC, de forma tal que la proliferación de dichas células de mieloma múltiple se suprima de forma detectable. En cierto aspecto, se divulga en la presente un método para suprimir la proliferación de células de mieloma múltiple in vivo, que comprende
- 35 administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de OPAC a un individuo que comprende células de mieloma múltiple, en donde dicha administración reduce de forma detectable la proliferación de dichas células de mieloma múltiple. En un aspecto específico, dicha administración reduce de forma detectable (por ejemplo, mejora) uno o más síntomas o signos de mieloma múltiple, o reduce el empeoramiento de dichos síntomas o signos de mieloma múltiple.
- 40 Las OPAC, útiles en los métodos divulgados en la presente, son células osteogénicas adherentes de corion (pero no de contorno coriónico (liso)) que pueden identificarse y seleccionarse mediante las características morfológicas, de marcador y de cultivo descritas al menos en la Sección 5.1, anteriormente.
- 5.2.1.2 Terapias de combinación*
- El tratamiento de un cáncer relacionado con los huesos, por ejemplo, mieloma múltiple, puede comprender la administración de OPAC, en combinación con otra terapia, al individuo que tiene el cáncer.
- 45 De esta forma, en otro aspecto, se divulga en la presente un método para tratar a un individuo que tiene cáncer relacionado con los huesos, por ejemplo, mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo OPAC, una población de OPAC o una población de células que comprende OPAC, en combinación con una o más terapias anticáncer, por ejemplo, una o más quimioterapias o compuestos quimioterapéuticos. Dichas terapias anticáncer pueden administrarse al individuo al mismo tiempo que, durante el mismo curso de tratamiento que, o de forma
- 50 separada de, dicha administración de OPAC. En un aspecto específico, la administración de dichas otras terapias anticáncer se administra de forma secuencial con la administración de dichas OPAC. En un aspecto más específico, dicha otra terapia anticáncer o terapias anticáncer se administran a dicho individuo antes de la administración de dichas OPAC; por ejemplo, un curso de dichas otras terapias anticáncer se administra al individuo, y se completa antes de la administración al individuo de OPAC. En otro aspecto, dichas OPAC se administran al individuo antes de
- 55 la administración de dichas otras terapias anticáncer; por ejemplo, un curso de OPAC se administra a dicho individuo antes de la administración de dichas otras terapias anticáncer, y se completa, antes de la administración al individuo de dicha terapia anticáncer o terapias anticáncer.

En un aspecto específico, el agente anticáncer es melfalán (también conocido como mostaza de L- fenilalanina o L-PAM; nombre comercial Alkeran). De esta forma, en un aspecto, el método para el tratamiento de un individuo que padece mieloma múltiple comprende administrar a dicho individuo melfalán, por ejemplo, dosis terapéuticamente efectivas de melfalán. La administración es normalmente oral o intravenosa. En otro aspecto específico, el agente anticáncer es talidomida. En otro aspecto específico, el agente anticáncer es pomalidomida (comercializada con el nombre comercial ACTIMID®); o lenalidomida (comercializada con el nombre comercial REVLIMID®); o lenalidomida en combinación con dexametasona. En otro aspecto específico, el tratamiento anticáncer es bortezomib (VELCADE®). En otro aspecto específico, el agente anticáncer comprende una combinación de melfalán, prednisona y talidomida (administrados por separado o juntos). En otro aspecto específico, el agente anticáncer es bortezomib, melfalán y prednisona (administrados por separado o juntos).

Otros agentes anticáncer se conocen bien en la técnica. Los agentes incluyen, a modo no taxativo: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleuquina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; amsacrina; anastrozol; antramincina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetímero; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carcelesina; cedefingol; celecoxib (inhibidor de COX-2); clorambucilo; cirolemicina; cisplatina; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatina; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziouona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifena; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflomitina; elsamitrucina; enloplatina; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofosina; iproplatina; irinotecán; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedopa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamincina; ormaplatina; oxisurán; paclitaxel; pegaspargasa; pelliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromán; pipsulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtraceno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatina; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalano sódico; taxotero; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucaronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vaporeotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatina; zinostatina; y clorhidrato de zorubicina.

Otros fármacos anticáncer incluyen, a modo no taxativo: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acifulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleuquina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulinico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética anti-dorsalizante 1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplaston; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de apoptosis; reguladores de apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; desaminasa de arginina; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamincina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calfofostina C; derivados de camptotecina; capecitabina; carboxamide-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de la caseína quinasa (ICOS); castanoespermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; sulfonamida de cloroquinóxalina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogos de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidenmina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxana; dexverapamil; diaziouona; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; espiromustina de difenilo; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxilfluridina; doxorubicina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebseleno; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogos de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorunicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de

glutaciona; hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastato; imatinib (por ejemplo, GLEEVEC®), imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor de los receptores del factor de crecimiento 1 tipo insulina; agonistas de interferón; interferones; interleuquinas; iobenguano; iododoxorubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplaquinolida; cahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptolestatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia, interferón alfa de leucocitos; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipofílico; compuestos de platino lipofílicos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de luteccio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastato; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasa de matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor del crecimiento de fibroblastos de mitoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; Erbitux, gonadotrofina coriónica humana; lípido monofosforílico A+ sk de pared celular miobacteriana; mopidamol; agente anticáncer de mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; oblimersen (GENA SENSE®); O⁶-bencilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrona; oracina; inductor de la citoquina oral; ormaplatina; osaterona; oxaliplatino; oxanomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrhizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; paceliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosán sódico; pentostatina; pentrozol; perflubrón; perfosfamida; alcohol perílico; fenacinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador de plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; bis-acridona de propilo; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune en base a proteína A; inhibidor de proteína quinasa C; inhibidores de proteína quinasa C, microalgal; inhibidores de fosfatasa de proteína tirosina; inhibidores de fosforilasa de nucleósido de purina; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcositol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de transducción de señales; sizofirán; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiastatina 1; escualamina; estipiámidica; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista de los péptidos intestinales vasoactivos superactivo; suradista; suramina; swainsonina; talimustina; metiodida de tamoxifén; tauromustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; tempoporfina; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de la timopoyetina; timotrinan; hormona estimuladora de la tiroides; etiopurpruina de etilo de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetrona; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vaporeotida; variolina B; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimálámero de zinostatina.

En otros aspectos, la terapia de combinación comprende la administración de OPAC a un individuo en combinación con un inhibidor de osteoclastos. El inhibidor de osteoclastos puede ser un inhibidor de RANKL, por ejemplo, Denosumab. En otra realización específica, el inhibidor de osteoclastos o ser un inhibidor de integrina o catepsina K.

En otro aspecto, la terapia de combinación comprende la administración de OPAC en combinación con bifosfonatos. Específicamente, los bisfosfonatos son clodronato y/o pamidronato.

5.2.2 Tratamiento de defectos óseos usando OPAC

Pueden utilizarse poblaciones de OPAC para tratar defectos óseos, por ejemplo, defectos óseos que derivan de traumatismo, o de enfermedad, por ejemplo, una enfermedad que no sea un cáncer relacionado con los huesos. Las OPAC pueden utilizarse también para tratar cualquier enfermedad, trastorno o afección que resulte en, o se relacione con, la pérdida de hueso. Tal como se utiliza en la presente, "tratar" comprende la cura, el remedio, la mejora, la disminución de la gravedad o la reducción en el transcurso de tiempo de una enfermedad, trastorno o afección o cualquier parámetro o síntoma de la misma.

También pueden utilizarse poblaciones aisladas de OPAC para tratar fracturas óseas, por ejemplo, fracturas óseas no consolidadas. También pueden utilizarse poblaciones aisladas de OPAC para fusionar las vértebras juntas con el fin de, por ejemplo, completar una fusión espinal en un sujeto que lo necesita. Las poblaciones aisladas de OPAC, en combinación con poblaciones de células madre o progenitoras, también pueden utilizarse para tratar las anteriores.

Las OPAC pueden combinarse con un sustrato, por ejemplo, una matriz, para formar una composición implantable. Por ejemplo, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición implantable, que

comprende OPAC. En una realización específica, la composición implantable comprende una matriz. En una realización más específica, dicha matriz es un andamio tridimensional. En otra realización más específica, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina o vitronectina. En otra realización específica, dicha matriz comprende hidroxiapatita. En una realización más específica, dicha matriz comprende colágeno e hidroxiapatita, por ejemplo, la matriz es HEALOS®. En otra realización más específica, la matriz es una membrana amniótica o un biomaterial derivado de membrana amniótica. En otra realización más específica, dicha matriz comprende una proteína de membrana extracelular. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto sintético. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otra realización más específica, dicho compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, citoquina, anticuerpo o molécula orgánica de menos de 5.000 daltones. En ciertas realizaciones, la matriz es un polímero degradable sintético tal como, por ejemplo, ácido poliláctico y ácido poliglicólico. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de β -fosfato tricálcico, un sustrato de β -fosfato tricálcico-colágeno, un sustrato de colágeno, un sustrato de fosfato de calcio, un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado, un sustrato de ácido hialurónico o un sustrato cerámico. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de β -fosfato tricálcico. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de β -fosfato tricálcico-colágeno. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de colágeno. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de fosfato de calcio. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado.

Las OPAC y poblaciones de OPAC también pueden inducirse para diferenciación en un tipo de célula particular, ya sea ex vivo o in vivo, en preparación para administración a un individuo que necesita dichas células, o células diferenciadas de dichas células. Por ejemplo, las OPAC pueden inyectarse en un órgano dañado, por ejemplo, un hueso dañado, para neogénesis de órganos y reparación de lesión in vivo. Dicha lesión puede ser debido a afecciones y trastornos que incluyen, a modo no taxativo, defectos óseos incluidas lesiones que resultan de osteoporosis, cáncer, fracturas y afecciones espinales tratables con, por ejemplo, fusión espinal. Las OPAC pueden inyectarse en el hueso dañado solas o pueden introducirse con un sustrato implantable tal como se describe en la presente.

Cuando las OPAC se administran como una suspensión o inyectable líquido, las células pueden administrarse por vía intravenosa o, preferiblemente, en el sitio del defecto óseo, por ejemplo, fractura.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona OPAC para uso en un método para tratar defectos óseos en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición implantable o inyectable que comprende una población de OPAC proporcionada en la presente, tratando de ese modo el defecto óseo en el sujeto. En ciertas realizaciones, el defecto es una lesión osteolítica asociada con un cáncer, una fractura ósea o una columna, por ejemplo, que necesita fusión. En ciertas realizaciones, la lesión osteolítica se asocia con mieloma múltiple, cáncer óseo o cáncer metastásico. En ciertas realizaciones, la fractura ósea es una fractura no consolidada. En ciertas realizaciones, una composición implantable se implanta quirúrgicamente, por ejemplo, en el sitio del defecto óseo. En ciertas realizaciones, una composición inyectable se administra quirúrgicamente a la región del defecto óseo. En ciertas realizaciones, la composición inyectable se administra sistémicamente.

En una realización específica, la composición implantable que comprende OPAC comprende una matriz. En una realización más específica, dicha matriz es un andamio tridimensional. En otra realización más específica, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina o vitronectina. En otra realización más específica, la matriz es una membrana amniótica o un biomaterial derivado de membrana amniótica. En otra realización más específica, dicha matriz comprende una proteína de membrana extracelular. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto sintético. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otra realización más específica, dicho compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, citoquina, anticuerpo o molécula orgánica de menos de 5.000 daltones. En ciertas realizaciones, la matriz es un polímero degradable sintético tal como, por ejemplo, ácido poliláctico y ácido poliglicólico. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable se selecciona del grupo que consiste en un sustrato de β -fosfato tricálcico, un sustrato de β -fosfato tricálcico-colágeno, un sustrato de colágeno, un sustrato de fosfato de calcio, un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado, un sustrato de ácido hialurónico y un sustrato cerámico. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de β -fosfato tricálcico. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de β -fosfato tricálcico-colágeno. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de colágeno. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de fosfato de calcio. En ciertas realizaciones, el sustrato de andamio implantable es un sustrato de colágeno placentario humano mineralizado.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para formular una composición inyectable que comprende combinar una población de OPAC con ácido hialurónico o colágeno inyectable. En otro aspecto, se proporciona en la presente una composición inyectable que comprende OPAC y ácido hialurónico o colágeno.

Las OPAC pueden administrarse sin cultivarse en condiciones que hacen que las OPAC se diferencien. Alternativamente, las OPAC pueden cultivarse en, por ejemplo, un medio osteogénico durante, por ejemplo, aproximadamente 1-20 días, antes de la administración. Alternativamente, las OPAC pueden aislarse y sembrarse en una matriz, luego cultivarse en medio osteogénico durante, por ejemplo, aproximadamente 1-20 días. En otra

realización, las OPAC pueden cultivarse en, por ejemplo, un medio osteogénico durante, por ejemplo, aproximadamente 1-20 días, luego se siembran en una matriz, se cultivan en medio osteogénico tal como se describe en la presente durante, por ejemplo, aproximadamente 1-20 días.

5 En otras realizaciones, las poblaciones aisladas de OPAC pueden utilizarse en terapias o protocolos para regeneración o reemplazo de tejido autólogo o heterólogo, incluido, a modo no taxativo, el tratamiento de los defectos epiteliales córneos, la reparación de cartílagos, la dermoabrasión facial, las membranas mucosas, membranas timpánicas, revestimientos intestinales, estructuras neurológicas (por ejemplo, retina, neuronas de adición en membrana basales, neuronas olfatorias en epitelio olfatorio), reparación de quemaduras y heridas para lesiones traumáticas de la piel, o para reconstrucción de otros órganos o tejidos dañados o enfermos.

10 En ciertas realizaciones, una población aislada de OPAC se utiliza en reconstitución hematopoyética en un individuo que ha sufrido una pérdida parcial o total de células madre hematopoyéticas, por ejemplo, individuos expuestos a dosis letales o subletales de radiación (ya sea industrial, médica o militar); los individuos que se han sometido a mieloablación como parte de, por ejemplo, terapia contra el cáncer y similares. Las poblaciones aisladas de OPAC pueden utilizarse en lugar de, o para complementar, médula ósea o poblaciones de células madre derivadas de
15 médula ósea. Normalmente, aproximadamente 1×10^8 a 2×10^8 de células mononucleares de médula ósea por kilogramo de peso del paciente se infunden para inserción en un trasplante de médula ósea (es decir, aproximadamente 70 ml de médula para un donante de 70 kg). Para obtener 70 ml es necesaria una donación intensiva y pérdida considerable de sangre de donante en el proceso de donación. Una población aislada de OPAC para reconstitución hematopoyética puede comprender, en varias realizaciones, aproximadamente, al menos o lo
20 sumo 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más OPAC.

Las OPAC proporcionadas en la presente, solas o en combinación con otra población de células madre o células progenitoras, pueden utilizarse en la fabricación de un tejido u órgano in vivo. Los métodos proporcionados en la presente comprenden el uso de OPAC para sembrar una matriz y para cultivarse en las condiciones apropiadas para
25 que las células se diferencien y pueblen la matriz. Los tejidos y órganos obtenidos mediante los métodos proporcionados en la presente pueden utilizarse para una variedad de fines, incluidos fines de investigación y terapéuticos.

En una realización preferida, las OPAC tal como se proporcionan en la presente, y las poblaciones de OPAC, pueden utilizarse para trasplantes autólogos y alogénicos, incluidos trasplantes hematopoyéticos tipo HLA compatibles y no compatibles. En una realización del uso de OPAC como trasplantes hematopoyéticos alogénicos, el huésped es tratado para reducir el rechazo inmunológico de las células donantes o para crear inmunotolerancia (ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.800.539 y 5.806.529). En otra realización, el huésped no es tratado para reducir el rechazo inmunológico o para crear inmunotolerancia.

6. Ejemplos

35 6.1 Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de OPAC

6.1.1 Materiales y métodos

Aislamiento de OPAC: Se recolectó placenta a término de madres donantes saludables después de obtener el consentimiento informado. El tejido coriónico se separó manualmente del amnión y se extirparon 12g de tejido coriónico y se cortó en trozos de 1 mm^3 . El tejido cortado se transfirió luego a una solución de 240 mL de dispa II a una concentración de 2,4 U/mL; se incubó el tejido con dispa II durante 1 hora (h) a 37°C con agitación a 80 RPM. Después de la incubación con dispa, los tejidos digeridos se dividieron en alícuotas en tubos de 50 mL para permitir la centrifugación; la muestra de tejido digerido se centrifugó a 220 g durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Después de decantar cuidadosamente los sobrenadantes, los tejidos granulados se resuspendieron y se agruparon en una solución de colagenasa II tibia (270 U/mL en un volumen de 240 mL) y se incubaron durante
40 1 h a 37°C con agitación a 80 RPM. Los productos digeridos se dividieron en alícuotas en tubos de 50 mL para permitir la centrifugación; la muestra de tejido digerido se centrifugó a 220 g durante 5 minutos a TA. La enzima presente en tejidos digeridos se neutralizó con 5% de lavado de FBS/PBS. Las muestras se sometieron nuevamente a centrifugación (220g durante 5 minutos a TA). Los gránulos (que contenían células liberadas y tejido) se resuspendieron luego en 20% de FBS (Hyclone)/ α -MEM (Invitrogen) que contenía 1X penicilina-estreptomina y 1X
45 1-glutamina o medios de 10% de FBS(Hyclone)/ α -MEM (Invitrogen) que contenían también 1X penicilina-estreptomina y 1X 1-glutamina.

Aislamiento de OPAC por adhesión selectiva

Como parte de la estrategia de adhesión selectiva, las suspensiones celulares (obtenidas tal como se describió anteriormente) se agregaron a los matraces que habían sido preresucubiertos con fibronectina (FN, Sigma), colágeno (COL, StemCell Technologies), vitronectina (VN, Sigma) y laminina (LN, Sigma). Los matraces se recubrieron incubando los matraces con soluciones de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada proteína durante 1 h a temperatura ambiente para fibronectina y colágeno, 1 h a 37°C para vitronectina y 2 horas a 37°C para laminina; después de estas incubaciones los m atraces se lavaron 2X con PBS.

Tres horas, 24 horas y 6 días después de sembrar las suspensiones celulares en los matraces recubiertos, las células/tejidos no adherentes se quitaron de los cultivos del establecimiento. Las células que permanecen en los matraces de cultivo tisular luego se dejaron proliferar. Una vez que los cultivos alcanzaron aproximadamente 80-90% de confluencia, las células fueron criopreservadas.

- 5 Las células adherentes derivadas de corion (OPAC) se separaron en base a la expresión de la superficie celular de CD200 usando una técnica de clasificación celular asistida magnética (MACs) usando un anticuerpo anti-CD200-PE humano (BD Biosciences, cat 552475), microperlas anti-PE (Miltenyi, cat No. 130-048-801), y columnas de MACs (Miltenyi) de acuerdo con el protocolo de las columnas MACs de Miltenyi.

Cultivo de OPAC

- 10 Las condiciones de la estrategia de adhesión selectiva que mostraron los niveles más altos de inducción de fosfatasa alcalina (AP) (recubrimientos de LN o VN, 20% de FBS/ α -MEM, 6 días de adhesión de establecimiento) se expandieron también en condiciones que fomentaron la funcionalidad osteogénica. Estas condiciones incluían el subcultivo sobre superficies recubiertas con fibronectina, usando medios de células madre mesenquimales disponibles en el mercado, o usando suero bovino fetal calificado como célula madre mesenquimal. Dos líneas celulares de la matriz de adhesión selectiva original se subcultivaron de acuerdo con la siguiente matriz sobre superficies recubiertas con LN, VN o FN y con los tres medios representados en la Tabla 2.

Tabla 2:

Recubrimiento de establecimiento

	LN		VN		
medios	1	LN	FN	VN	FN
	2	LN	FN	VN	FN
	3	LN	FN	VN	FN

1. FBS Hyclone / α MEM

2. Medios de MSC Lonza

3. FBS calificado como MSC (Stem Cell Tech)/ α MEM

- 20 Las células obtenidas usando la matriz de adhesión selectiva que se muestra en la Tabla 2 se analizaron luego mediante citometría de flujo y para actividad de fosfatasa alcalina. Las células se caracterizaron usando los siguientes ensayos: citometría de flujo, análisis de expresión génica y actividad de fosfatasa alcalina (AP) y secreción de proteínas.

Expresión génica

- 25 Las células se tripsinizaron y se realizaron conteos celulares nucleados para determinar un mínimo de 1×10^6 a 1×10^7 células. Las células se lisaron usando protocolo para lisis del kit Qiagen RNEasy; luego los lisados se pasaron a través de una trituradora QIA para maximizar la lisis celular. El aislamiento del ARN se realizó usando un kit Qiagen RNEasy.

- 30 La cantidad de ARN se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop ND1000; un mínimo de 28 ng/ μ l de ARN analizado mediante Nanodrop ND1000. La calidad del ARN se midió mediante el bioanalizador Agilent 2100; se utilizó una relación de ARNr entre 28S/18S de 2,0 como determinante de ARN de buena calidad. Las reacciones de ADNc se generaron a partir de ARN usando un protocolo de kit de archivo de ADNc de alta capacidad. Las reacciones por PCR en tiempo real se realizaron usando una mezcla maestra para PCR universal TAQMAN® de Applied Biosystems. La reacción por PCR utiliza la actividad 5' de ADN polimerasa Amplitaq Gold para escindir una sonda TAQMAN® durante la PCR. La sonda TAQMAN® contiene un tinte reportero en un extremo 5" y un tinte aplacador en el extremo 3" de la sonda. La acumulación de los productos de PCR se detecta directamente monitoreando el aumento de fluorescencia del tinte reportero.

- 40 Se aisló ARN de OPAC, células madre placentarias, células madre mesenquimales (ScienCell Research Labs., Carlsbad, California) y fibroblastos dérmicos humanos (ScienCell Research Labs., Carlsbad, California) para el superarreglo de osteogénesis y de OPAC y células madre placentarias (para el arreglo de TGF-BMP). Las células se cultivaron en medios basales (condiciones de crecimiento para cada tipo de célula respectivo) durante 3 días y se cultivaron en medios osteogénicos (condiciones osteogénicas) durante una semana. Las muestras se aislaron en cuadruplicado usando el RNEasy Plus Mini Kit de Qiagen. Todo el aislamiento de ARN fue de buena calidad y se logró suficiente rendimiento (tal como se midió mediante Nanodrop para concentración y chip Agilent para pureza).

Los arreglos se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante y los resultados se cuantificaron en un ABI 7900.

Actividad de fosfatasa alcalina

5 Para inducir la osteogénesis, las células se sembraron en medio de cultivo a 5×10^3 células/cm² durante aproximadamente 3 días, y luego se mantuvieron en un medio de cultivo o se indujeron con medio de OS (10% de FBS/DMEM) que contenía ácido ascórbico (50 µg/mL), dexametasona (0,1 µM) y α-glicerofosfato (10 mM) por hasta 2 semanas; las células se alimentaron cada dos semanas con un medio de crecimiento u osteogénico nuevo.

La actividad de la fosfatasa alcalina (AP) en lisados celulares se determinó usando un ensayo colorimétrico (Cell Biolabs, San Diego, CA), que mide la formación de producto de p-nitrofenol;

10 La actividad de AP se normalizó hasta µg de ADN (para representar cualquier diferencia de número de células) usando el ensayo fluorescente de ADNc PicoGreen. La cantidad de p-nitrofenol formada por lisados celulares se determinó mediante análisis de regresión lineal de una curva estándar generada usando cantidades conocidas de p-nitrofenol (proporcionado por el kit). La actividad de fosfatasa alcalina también se evaluó histoquímicamente siguiendo las instrucciones del fabricante usando un kit (No. 85) de Sigma.

15 *Ensayo de unidad de formación de colonias - Actividad de fosfatasa alcalina*

20 OPAC preclasificadas que contenían una mezcla de células CD200⁻ y CD200⁺, poblaciones CD200⁺ y fracciones no retenidas (que contenían una concentración relativamente alta de poblaciones CD200 negativas/tenues) se sembraron en medios de diferenciación osteogénica (10% de FBS/DMEM/ 50 µg/ml de ácido ascórbico/0,1 µM de dexametasona) a 22,5 células/cm² en 35 mm de placas con rejillas. Las células se alimentaron cada dos semanas con medios osteogénicos y después de 10 días las células se evaluaron histoquímicamente para actividad de fosfatasa alcalina siguiendo las instrucciones del fabricante usando un kit (No. 85) de Sigma. La cantidad de colonias positivas para fosfatasa alcalina se cuantificó visualmente usando un estereomicroscopio.

Tinción inmunofluorescente

25 Las células se cultivaron sobre portaobjetos Labtek a 5000 células/cm² y se cultivaron durante 2-3 días. Las células se fijaron con 3,7% de formaldehído durante 9 minutos, luego se lavaron 3X con PBS. Después del bloqueo durante 20 minutos a temperatura ambiente con solución amortiguadora de bloqueo (10% de suero de cabra, 2X de caseína, 0,3% de tritón), las células se tiñeron para NG2 (sulfato de condroitina) y α-actina de músculo liso usando anticuerpos de conejo anti-NG2 humano (Chemicon, dilución 1:150), anti-α-actina de músculo liso humana de ratón (Dako, dilución 1:30); las células se incubaron con anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras se lavaron luego con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios etiquetados fluorescentemente, AlexaFluor488 anti-conejo (Invitrogen, dilución 1:400) o AlexaFluor488 anti-ratón (Invitrogen, dilución 1:400); las células se incubaron con anticuerpos secundarios durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron 3X con PBS y se montaron usando medios de montaje que contenían DAPI para contrateñir para núcleos. Se tomaron imágenes de las células usando un microscopio de epifluorescencia.

35 *Ensayo Luminex*

Los factores secretados en muestras de medios acondicionados de células se analizaron usando el panel de huesos humanos 1B-11plex (cat No. HBN1B-51K-11) de Millipore, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Arreglos de anticuerpos

40 Se cultivaron OPAC, células madre mesenquimales, células madre placentarias y fibroblastos en medios basales (condiciones de crecimiento) durante 3 días y luego se cambiaron a medios libres de suero durante 24 horas. Las muestras de medios se pasaron sobre un Arreglo de Anticuerpos a base de Etiqueta de Biotina RAYBIO® de RayBiotech según las instrucciones del fabricante. Se tomaron imágenes de los arreglos de quimioluminiscencia y se analizaron los tamaños de los puntos usando un Sistema de Formación de Imágenes GellLogic 2200 y un programa de formación de imágenes Kodak MI, respectivamente.

45 6.1.2 Resultados

Adhesión selectiva y expresión génica

50 Todas las condiciones de adhesión de los 6 días produjeron números suficientes de células para análisis, sin embargo, las condiciones de adhesión de 3 h y 24 h en 10% de FBS/DMEM no proliferaron lo suficiente para producir suficiente células para análisis. Los genes seleccionados para análisis de expresión de ARNm incluyeron: fosfatasa alcalina (AP), DLX5 (factor de transcripción), sialoproteína ósea, RUNX2 (factor de transcripción), colagenasa III, osterix (factor de transcripción) y osteocalcina. De estos genes, las células derivadas del 20% de medios de FBS/αMEM, adhesión de 6 días, LN, VN y recubrimiento COL mostraron una mayor expresión de los niveles de ARNm de AP en comparación con las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (Figura

1). Todos los demás genes analizados demostraron niveles más bajos de expresión génica en células placentarias recientemente aisladas en comparación con células madre mesenquimales.

5 Los resultados de inmunofenotipificación mostraron aumentos significativos de las poblaciones CD200^{tenue}/CD200⁻ en las condiciones de adhesión de 6 días en comparación con células madre placentarias, aunque los aumentos más altos se detectaron en condiciones recubiertas con LN, VN, COL en 20% de FBS/αMEM. (Figura 2). La citometría de flujo también confirmó que las OPAC son CD34⁻ y CD105⁺ (Figura 2).

10 Las permutaciones de cultivo, a saber las condiciones recubiertas de LN, VN, COL en 20% de FBS/αMEM, que produjeron poblaciones mayores de CD200^{tenue}/CD200⁻, también demostraron aumentos significativos de las poblaciones de AP⁺ y Stro-1⁺ mediante citometría de flujo (Figura 3); estas condiciones también exhibieron niveles altos de expresión del gen AP con respecto a testigos de MSC. Estas mismas condiciones también demostraron aumentos significativos de poblaciones positivas para SSEA3 y SSEA4 (Figura 4).

15 Los análisis funcionales, tal como se determinó mediante actividad de AP, demostraron actividad de AP inducible en condiciones de diferenciación osteogénica (10 días de inducción) en los sustratos recubiertos con FN, LN, VN, COL en condiciones de 20% de FBS/αMEM, aunque la condición recubierta con FN demostró una inducción más moderada (Figura 5).

Caracterización de células cultivadas

20 La inmunofenotipificación de células resultante de la propagación en varias condiciones de cultivo demostró que, en las poblaciones CD200⁺, entre 40-60% de las células fueron CD200⁺, con respecto a ~100% para las células madre placentarias (PDACTM) descritas, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos No. 2007/0275362. Hubo un leve aumento en el porcentaje de células positivas AP con respecto a PDACTM, mientras que el porcentaje de células positivas CD105 permaneció igual para PDACTM (Figura 6).

25 Para definir mejor las células derivadas de corion (OPAC), se realizó una tinción de inmunofluorescencia para teñir los marcadores asociados con las células que mostraron actividad osteogénica. Los pericitos, que son células asociadas con la vasculatura y conocidas por albergar una mancha de actividad osteogénica positivamente para NG2 y α-actina de músculo liso. Por lo tanto, se realizaron para estos marcadores estudios de tinción de inmunofluorescencia. Las OPAC exhibieron dos diferencias en la tinción en comparación con PDACTM: (1) una falta de tinción para la α-actina de músculo liso en comparación con PDACTM positivos para actina y (2) localización celular difusa de NG2 en comparación con la tinción de NG2 localizada de adhesión focal para PDACTM estándares; la localización de NG2 a estructuras subcelulares tales como adhesiones focales trae implicaciones en la actividad de NG2 (los datos no se muestran).

30 Después de 10 días de inducción en condiciones de diferenciación osteogénica, las condiciones del medio de LN-LN 1 y el medio de VN-VN 1, tal como se muestra en la Figura 7, mostraron la inducción más alta (osteogénica/basal) de actividad de AP (flecha negra) mientras que el medio de LN-LN 3 y el medio de VN-FN 1 demostraron una actividad de AP general más alta (flecha abierta).

35 Para abordar si la actividad funcional, tal como actividad osteogénica y la supresión de células T, derivada de la fracción baja/negativa para CD200 o en la fracción CD200⁺ de estas preparaciones celulares de adhesión selectiva, MACs (separación de células magnéticas asistida) usando un anticuerpo anti-CD200 humana se utilizó para separar estas 2 poblaciones celulares. Las 4 líneas celulares que se identificaron anteriormente que tienen una inducción de AP más alta o actividad de AP general más alta se procesaron para separación magnética en base a la expresión de CD200 y se analizaron mediante citometría de flujo, actividad de AP y formación de unidad de formación de colonias positivas de AP.

40 La inmunofenotipificación mostró >85% de poblaciones CD200⁺ puras para 2 de 4 muestras y que la fracción de flujo aún contenía células CD200⁺ (Figura 8).

45 Las células resultantes de la separación se indujeron con medios osteogénicos durante 10 días y se analizaron para evaluar la actividad de AP. Los resultados muestran que la fracción de CD200⁺ había disminuido la inducibilidad de AP en comparación con las fracciones de CD200^{tenue}/CD200⁻ (Figura 9).

50 Los ensayos de CFU (ensayo de unidad de formación de colonias) miden las células progenitoras en una población; por ejemplo, comúnmente se utilizan ensayos de CFU-F para medir la cantidad de progenitores en el producto aspirado de la médula ósea. El ensayo de CFU-AP estima el número de precursores osteoblásticos potenciales en una población. Las fracciones de CD200 se sembraron en placas con rejillas de 35 mm durante 10 días en medios osteogénicos y se tiñeron para fosfatos alcalinos. Se cuantificó el número de colonias por placa y el número de colonias positivas de AP. Las fracciones de CD200⁺ no mostraron CFU-AP y la actividad de CFU total más baja, mientras que las pre-clasificadas, que contenían las poblaciones más altas tenues/negativas para CD200 mostraron el mayor número de actividad de CFU positivas para AP y actividad de CFU. De manera comparativa, las poblaciones CD200⁺ tuvieron niveles mucho más bajos de CFU-AP y actividad total de CFU (Figuras 10 y 11).

55

Un ensayo Luminex 11 X para proteínas secretadas relacionadas con los huesos se realizó sobre muestras de medios acondicionados de OPAC, células madre placentarias CD200⁺ (PDACTM) y células madre mesenquimales (MSC). Las células se cultivaron durante 3 días en sus respectivos medios, luego se incubaron con DMEM libre de suero durante 24 horas. Para evaluar el comportamiento de las células en condiciones osteogénicas, las células se cultivaron durante 3 días en condiciones de crecimiento, se sometieron a medios de diferenciación osteogénica (medios complementados con ácido ascórbico y dexametasona) durante 7 días, luego se incubaron con DMEM libre de suero durante la noche. Los resultados muestran que de los 3 tipos de células, las OPAC secretaron constitutivamente los niveles más altos de osteoprotegerina. Asimismo, cuando se cultivan los tres tipos celulares en condiciones osteogénicas, sólo las OPAC exhibieron una regulación hacia arriba de la secreción de osteoprotegerina, mientras que las MSC y PDACTM mostraron osteoprotegerina regulada hacia abajo. Esto implica que en un microambiente óseo, las OPAC pueden estar mejor adaptadas para inhibir la actividad de los osteoclastos por medio de la liberación de niveles altos de osteoprotegerina.

El análisis de expresión de 84 genes relativos a osteogénesis en OPAC, PDACTM, MSC y fibroblastos cultivados en medio de cultivo y en medio osteogénico se realizó usando un arreglo de PCR para osteogénesis humana RT2 Profiler (SABiosciences, Frederick, Maryland). El medio de cultivo utilizado en el experimento fue α MEM/20% de Suero Bovino Fetal que comprendía 1X penicilina-estreptomicina y 1X L-glutamina y un medio osteogénico utilizado en el experimento fue α MEM/20% de Suero Bovino Fetal que comprendía 1X penicilina-estreptomicina, 1X L-glutamina, 50 μ g/mL de ácido ascórbico y 100 nM de dexametasona. La expresión de los genes relacionados con la osteogénesis se midió en OPAC, PDACTM, MSC y fibroblastos cultivados en condiciones de cultivo y diferenciación osteogénica.

La expresión génica (tal como se mide mediante el valor Ct, el ciclo de PCR en el que un aumento estadísticamente considerable de señal de fluorescencia se detecta primero) se encontró para la mayoría de los genes osteogénicos medidos en todos los tipos de células. Las OPAC mostraron un único perfil de expresión génica cuando se compararon con PDACTM, MSC y fibroblastos (Tablas 3A-3C, respectivamente) y un perfil de inducción de expresión génica único, cuando las células se cambiaron de cultivo a un medio osteogénico, cuando se compararon con PDACTM, MSC y fibroblastos (Tablas 3D-3F, respectivamente). Los valores Ct (Tablas 3A-3C) son números obtenidos directamente del ciclador de PCR e informados como un rango; de esa forma, estos valores se convirtieron en una, dos, tres o cuatro señales positivas, tal como se explica más adelante. Para calcular las veces de cambio en la expresión génica en el medio de cultivo en comparación con el medio osteogénico, se aplica un factor de corrección a los valores Ct en la expresión de los genes domésticos. Este factor de corrección se normaliza para pequeñas diferencias en la cantidad de ARN utilizado en la PCR.

Tablas 3A-3C: Expresión de genes osteogénica (valores Ct) de OPAC con respecto a PDACTM (Tabla 3A), OPAC con respecto a MSC (Tabla 3B) y OPAC con respecto a fibroblastos (Tabla 3C) en medios de cultivo u osteogénicos, tal como definió anteriormente (n=2). El nivel de expresión de los genes se clasificó como ++++ (muy alto, Ct<20), +++ (alto, 20<Ct<25), ++ (medio, 25<Ct<30), + (bajo 30<Ct<35), - (bajo 35<Ct<40) o en blanco (sin señal detectada).

Tabla 3A:

Símbolo	OPAC		PDAC TM	
	G	O	G	O
AHSG	-		+	
ALPL	+	+	++	+
AMBN		+		
AMELY	+	+	+	+
ANXA5	++++	++++	++++	++++
BGLAP	++	++	++	++
BGN	+++	++	+++	+++
BMP1	+++	+++	+++	+++
BMP2	++	++	++	
BMP3	+			
BMP4	+++	+++	+++	+++
BMP5	+		+	
BMP6	++	++	++	++

ES 2 552 556 T3

Símbolo	OPAC		PDAC™	
	G	O	G	O
CALCR	+	++	+	+
CD36	++	+	++	+
CDH11	++++	++++	+++	+++
COL10A1	++	+	+	+
COL11A1	++	++	++	+++
COL12A1	++++	+++	++++	+++
COL14A1	+++	++++	++	+++
COL15A1	++++	++++	++	++
COL1A1	++++	++++	++++	++++
COL1A2	++++	++++	++++	++++
COL2A1	+	+	+	
COL3A1	++++	++++	++++	++++
COL4A3	+	+	+	+
COL5A1	++++	++++	++++	++++
COMP	+	++	+	+++
CSF2	+	+	+	
CSF3	+	++	+	-
CTSK	+++	++++	+++	++++
DMP1	-			
DSPP	+	+		
EGF	+	+	++	+
EGFR	+++	+++	+++	+++
ENAM	+	+		
FGF1	++	+	++	++
FGF2	+++	+++	+++	+++
FGF3		+		
FGFR1	++	++	++	++
FGFR2	++	+	+	+
FLT1	++	++	+++	++
FN1	++++	++++	++++	++++
GDF10		-		
ICAM1	+++	+++	+++	+++
IGF1	+	++	+	+
IGF1R	+++	+++	+++	+++
IGF2	+	++	++	++
ITGA1	+++	++++	+++	+++
ITGA2	++	+++	+++	++
ITGA3	+++	+++	+++	+++

ES 2 552 556 T3

Símbolo	OPAC		PDAC™	
	G	O	G	O
ITGAM			+	
ITGB1	++++	++++	++++	++++
MINPP1	+++	+++	+++	+++
MMP10	+	++	-	+
MMP2	++++	++++	++++	++++
MMP8	+	-	+	
MMP9	+	++++	+	+
MSX1	++	++	++	++
NFKB1	+++	+++	+++	+++
PDGFA	+++	+++	+++	++
PHEX	+	+	+	+
RUNX2	+++	++	+++	++
SCARB1	++	++	+++	++
SERPINH1	++++	++++	++++	++++
SMAD1	+++	+++	+++	++
SMAD2	+++	+++	+++	+++
SMAD3	+++	+++	+++	+++
SMAD4	+++	+++	+++	+++
SOX9	+	+	++	+
STATH	+	+	+	+
TFIP11	+++	+++	+++	+++
TGFB1	+++	++++	+++	+++
TGFB2	+++	+++	+++	+++
TGFB3	+++	++++	++	+++
TGFBR1	+++	+++	++	++
TGFBR2	++	++	++	+
TNF	+	+	++	+
TUFT1	+++	++	+++	++
TWIST1	+++	+++	++++	+++
VCAM1	+++	++	++++	+++
VDR	++	+++	+++	++
VEGFA	+++	+++	+++	+++
VEGFB	+++	+++	+++	+++

G: Expresión relativa con respecto a testigo en medio de cultivo.
O: Expresión relativa con respecto a testigo en medio osteogénico.

Tabla 3B

Símbolo	OPAC		MSC	
	G	O	G	O
AHSG	-		-	++
ALPL	+	+	++	+++
AMBN		+		
AMELY	+	+	+	+
ANXA5	++++	++++	++++	++++
BGLAP	++	++	+++	+++
BGN	+++	++	+++	++++
BMP1	+++	+++	+++	+++
BMP2	++	++	++	++
BMP3	+		+	+
BMP4	+++	+++	++	+++
BMP5	+		+	+
BMP6	++	++	++	++
CALCR	+	++	-	+
CD36	++	+	+	++
CDH11	++++	++++	+++	++++
COL10A1	++	+	++	+++
COL11A1	++	++	+++	++++
COL12A1	++++	+++	+++	++++
COL14A1	+++	++++	++	+++
COL15A1	++++	++++	++	++
COL1A1	++++	++++	++++	++++
COL1A2	++++	++++	++++	++++
COL2A1	+	+		+
COL3A1	++++	++++	+++	++++
COL4A3	+	+	+	++
COL5A1	++++	++++	+++	++++
COMP	+	++	+	+++
CSF2	+	+	+	+
CSF3	+	++	+	-
CTSK	+++	++++	+++	++++
DMP1	-			
DSPP	+	+		
EGF	+	+	+	++
EGFR	+++	+++	+++	+++
ENAM	+	+	+	+
FGF1	++	+	++	++

ES 2 552 556 T3

Símbolo	OPAC		MSC	
	G	O	G	O
FGF2	+++	+++	+++	+++
FGF3		+		+
FGFR1	++	++	++	++
FGFR2	++	+	+	++
FLT1	++	++	+	++
FN1	++++	++++	++++	++++
GDF10		-		-
ICAM1	+++	+++	+++	+++
IGF1	+	++	+	++
IGF1R	+++	+++	+++	+++
IGF2	+	++	+++	+++
ITGA1	+++	++++	+++	+++
ITGA2	++	+++	+++	++
ITGA3	+++	+++	+++	+++
ITGAM			+	
ITGB1	++++	++++	++++	++++
MINPP1	+++	+++	+++	+++
MMP10	+	++	+	+
MMP2	++++	++++	++++	++++
MMP8	+	-	+	+
MMP9	+	++++	+	
MSX1	++	++	+	+
NFKB1	+++	+++	+++	+++
PDGFA	+++	+++	++	++
PHEX	+	+	+	++
RUNX2	+++	++	+++	+++
SCARB1	++	++	+++	+++
SERPINH1	++++	++++	++++	++++
SMAD1	+++	+++	+++	+++
SMAD2	+++	+++	+++	+++
SMAD3	+++	+++	+++	+++
SMAD4	+++	+++	+++	+++
SOX9	+	+	++	+++
STATH	+	+	+	+
TFIP11	+++	+++	+++	+++
TGFB1	+++	++++	+++	+++
TGFB2	+++	+++	+++	+++
TGFB3	+++	++++	++	+++

Símbolo	OPAC		MSC	
	G	O	G	O
TGFBR1	+++	+++	++	++
TGFBR2	++	++	++	+
TNF	+	+	+	+
TUFT1	+++	++	++	++
TWIST1	+++	+++	+++	+++
VCAM1	+++	++	+++	+++
VDR	++	+++	++	+++
VEGFA	+++	+++	+++	+++
VEGFB	+++	+++	+++	++++

G: Expresión relativa con respecto a testigo en medio de cultivo.
O: Expresión relativa con respecto a testigo en medio osteogénico.

Tabla 3C:

Símbolo	OPAC		Fibroblasto	
	G	O	G	O
AHSG	-			-
ALPL	+	+	++	++
AMBN		+		
AMELY	+	+	+	+
ANXA5	++++	++++	++++	++++
BGLAP	++	++	++	++
BGN	+++	++	+++	+++
BMP1	+++	+++	+++	+++
BMP2	++	++	+	+
BMP3	+		-	
BMP4	+++	+++	+	++
BMP5	+			+
BMP6	++	++	+	++
CALCR	+	++	-	+
CD36	++	+	++	++
CDH11	++++	++++	+++	++++
COL10A1	++	+	++	+++
COL11A1	++	++	++	+++
COL12A1	++++	+++	+++	++++
COL14A1	+++	++++	+	++
COL15A1	++++	++++	+	++
COL1A1	++++	++++	+++	++++
COL1A2	++++	++++	++++	++++

ES 2 552 556 T3

Símbolo	OPAC		Fibroblasto	
	G	O	G	O
COL2A1	+	+		+
COL3A1	++++	++++	+++	++++
COL4A3	+	+	+	++
COL5A1	++++	++++	+++	+++
COMP	+	++	+	+++
CSF2	+	+	+	+
CSF3	+	++	++	+
CTSK	+++	++++	++++	++++
DMP1	-			
DSPP	+	+		
EGF	+	+	+	+
EGFR	+++	+++	+++	+++
ENAM	+	+	+	+
FGF1	++	+	+++	+++
FGF2	+++	+++	+++	+++
FGF3		+		
FGFR1	++	++	++	++
FGFR2	++	+		+
FLT1	++	++	++	++
FN1	++++	++++	++++	++++
GDF10		-		
ICAM1	+++	+++	+++	+++
IGF1	+	++		+
IGF1R	+++	+++	++	+++
IGF2	+	++	+	++
ITGA1	+++	++++	+++	+++
ITGA2	++	+++	++	++
ITGA3	+++	+++	+++	+++
ITGAM			+	+
ITGB1	++++	++++	++++	++++
MINPP1	+++	+++	++	+++
MMP10	+	++	-	+
MMP2	++++	++++	+++	++++
MMP8	+	-	+	++
MMP9	+	++++	+	+
MSX1	++	++	++	++
NFKB1	+++	+++	+++	+++
PDGFA	+++	+++	++	++

Símbolo	OPAC		Fibroblasto	
	G	O	G	O
PHEX	+	+	+	++
RUNX2	+++	++	++	+++
SCARB1	++	++	++	++
SERPINH1	++++	++++	++++	++++
SMAD1	+++	+++	++	++
SMAD2	+++	+++	+++	+++
SMAD3	+++	+++	++	+++
SMAD4	+++	+++	+++	+++
SOX9	+	+	+	+
STATH	+	+	+	+
TFIP11	+++	+++	+++	+++
TGFB1	+++	++++	+++	+++
TGFB2	+++	+++	++	+++
TGFB3	+++	++++	++	+++
TGFBR1	+++	+++	++	++
TGFBR2	++	++	+	++
TNF	+	+	+	+
TUFT1	+++	++	++	++
TWIST1	+++	+++	+++	++++
VCAM1	+++	++	+	+
VDR	++	+++	+++	+++
VEGFA	+++	+++	++	+++
VEGFB	+++	+++	+++	+++

G: Expresión relativa con respecto a testigo en medio de cultivo.
O: Expresión relativa con respecto a testigo en medio osteogénico.

5 Tablas 3D-3F: Diferencia en veces en la expresión de OPAC y PDACTM, MSC y fibroblastos de los genes seleccionados en un medio de cultivo en comparación con un medio osteogénico. Una diferencia en veces de 10 para un gen particular, por ejemplo, indica que el gen se induce diez veces en medio osteogénico en comparación con un medio de cultivo. Se muestran sólo los resultados en los que la inducción en veces del medio osteogénico en OPAC es al menos diez veces más alta o más baja que la inducción en veces en PDACTM (Tabla 3D), MSC (Tabla 3E) o fibroblastos (Tabla 3F) (se asignaron a los resultados en blanco un valor de 0 para selección).

Tabla 3D

Símbolo	OPAC	PDAC TM
	Diferencia en veces	Diferencia en veces
BMP2	11,65	
COL11A1	3,64	84,86
COL1A1	0,38	9,31
COL4A3	1,26	12,91
COL5A1	0,99	6,84
COMP	17,90	4095,78

ES 2 552 556 T3

Símbolo	OPAC	PDAC™
	Diferencia en veces	Diferencia en veces
CSF3	59,08	
CTSK	6,88	79,18
FGF1	0,12	1,81
FGFR2	0,27	76,81
MMP10	279,30	
MMP9	7079936,55	12,25
TGFB2	15,77	0,72

Diferencia en veces: Diferencia entre la expresión en el medio de cultivo y el medio osteogénico.
 En blanco: La diferencia en veces no pudo calcularse porque la fluorescencia de un tipo de célula era demasiado baja.

Tabla 3E:

Símbolo	OPAC	MSC
	Diferencia en veces	Diferencia en veces
ALPL	2,02	29,13
CD36	1,08	84,08
COL10A1	0,08	19,86
COL11A1	3,64	43,73
COL12A1	0,42	5,02
COL1A1	0,38	7,23
COL4A3	1,26	15,62
COMP	17,90	1629,84
CSF3	59,08	
CTSK	6,88	148,38
FGF1	0,12	1,93
FGFR2	0,27	88,30
IGF1R	4,21	1,53
IGF2	53,38	0,60
ITGA2	8,10	0,16
ITGA3	2,70	0,24
MMP10	279,30	1,44
MMP9	7079936,55	
TGFB2	15,77	0,64

Diferencia en veces: Diferencia entre la expresión en el medio de cultivo y el medio osteogénico.
 En blanco: La diferencia en veces no pudo calcularse porque la fluorescencia de un tipo de célula era demasiado baja.

Tabla 3F:

Símbolo	OPAC	Fibroblasto
	Diferencia en veces	Diferencia en veces
BMP2	11,65	0,95
BMP4	0,23	72,12
COL12A1	0,42	6,55
COMP	17,90	431,41
CSF2	2,16	0,12
CSF3	59,08	0,10
FGF1	0,12	3,26
IGF1	31,46	
ITGA2	8,10	0,54
MMP10	279,30	
MMP8		38,76
MMP9	7079936,55	0,40

Diferencia en veces: Diferencia entre la expresión en el medio de cultivo y el medio osteogénico.
 En blanco: La diferencia en veces no pudo calcularse porque la fluorescencia de un tipo de célula era demasiado baja.

5 Cuando las OPAC y PDACTM cultivadas en condiciones de cultivo se compararon usando un conjunto de 84 genes en la superfamilia de TGFβ/BMP, las OPAC generalmente mostraron una expresión más alta de genes relacionados con la formación ósea (Tabla 4). Las OPAC tuvieron mayor expresión génica que se relacionó con el soporte trófico de la formación ósea que incluye BMP (especialmente BMP-2) y TGF-β. Las OPAC también tuvieron mayor expresión génica que podría relacionarse con el soporte trófico de la inhibición de la formación ósea o la resorción ósea que incluye inhibinas y TGF-β (TGF-β está implicado en la formación y resorción ósea). La superfamilia de TGFβ/BMP representa un sistema de respuestas complejo de regulación de múltiples sistemas de órganos diferentes. El hecho de que los genes de esta superfamilia se expresan en OPAC a niveles más altos que en PDACTM indican que las OPAC tienen mayor capacidad para regular el metabolismo óseo que OPACTM.

Tabla 4:

Símbolo	OPAC	PDAC	Regulación hacia arriba/abajo (veces)
	CHRD	++	
GDF7	+	+	12,18
IGFBP3	++++	++	1187,56
INHA	++	+	16,38
TGFB2	+++	+++	-11,02

Regulación hacia arriba/abajo: Diferencia en veces entre OPAC/PDACTM

Tabla 4: Expresión génica de los miembros de la superfamilia de TGFβ/BMP (valores Ct) de OPAC, PDACTM, MSC y fibroblastos en medios de cultivo (n=3). El nivel de expresión de los genes se clasifica como ++++ (muy alto, Ct<20). +++ (alto, 20<Ct<25), ++ (medio, 25<Ct<30), + (bajo 30<Ct<35), - (bajo 35<Ct<40) o en blanco (sin señal detectada). La diferencia en veces representa la diferencia del nivel de expresión cuando las OPAC se comparan con PDACTM. Sólo se muestran los genes para los cuales la expresión en OPAC excedió la expresión en PDACTM, o para los cuales la expresión en PDACTM excedió la expresión en OPAC.

Además de la expresión génica, también se realizó el análisis de la secreción de proteínas (Arreglo de Anticuerpos en base a Etiqueta de Biotina RayBio® de RayBiotech) de OPAC, PDAC™, MSC y fibroblastos cultivados en condiciones de cultivo (Figura 13). Se identificó un total de 46 proteínas secretadas entre los 4 tipos de células. Las proteínas secretadas por OPAC, pero no PDAC™, incluyeron el factor II de coagulación/factor tisular, decorina, epirregulina, similar a folistatina 1, IGFBP6, IGF-IIR, IL-2R α (receptor de interleuquina 2 α), IL-12R β 2 (subunidad β 2 del receptor de interleuquina 12), IL-17RC (receptor de interleuquina C), IL-27 (interleuquina 27), proteína de unión beta 1 - TGF latente, NCAM-1/CD56 (molécula de adhesión celular neural 1), sFRP-4 (proteína 4 secretada relacionada con la proteína Frizzled), SMAD4, espinesina, TFP1 (inhibidor de la vía del factor tisular), TGF- β R1/ALK5 (receptor 1 beta del factor del crecimiento de transformación), TIMP-2 (inhibidor del tejido de metaloproteasas 2), y TSG-6 (gen 6 estimulado por factor de necrosis tumoral (TNF)). Las proteínas secretadas por OPAC pero no por MSC incluían decorina, epirregulina, FGF-7/KGF, IGFBP-3, IL-2R α (receptor alfa de interleuquina-2), IL-3R α (receptor alfa de interleuquina 3), IL-5R α (receptor alfa de interleuquina 5), IL-17RC, IL-27, NCAM-1/CD56, SMAD4, TFPI, TGF- β R1/ALK-5, TGF- β RIII (receptor 3 beta del factor de crecimiento de transformación) y TIMP2. Las proteínas, cuya expresión fue única para OPAC en comparación con PDAC™ y MSC, fueron decorina, epirregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, proteína 1 de unión al TGF-beta (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 y TIMP-2. De éstas, la decorina, IGFBP-6 y IL-27 están implicadas en la regulación ósea. De éstas, la proteína similar a filistatina 1, sFRP-4 y TSG-6 están implicadas en la regulación de los huesos.

También se mostró en un experimento separado que las OPAC no expresaron RANKL, como se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa; MSC derivada de médula ósea. Sin embargo, produjeron cantidades significativas de ARN para RANKL.

6.2 Ejemplo 2: Capacidad de OPAC de formación de huesos in vivo

Para evaluar la capacidad de OPAC de formación de huesos in vivo, se realizó un estudio in vivo usando un modelo de defecto craneano de reparación ósea. De manera experimental, se utilizaron cuarenta y ocho ratas atímicas macho Hsd:RH-Foxn1^{nu} (Harlan Laboratories, Indianapolis, Indiana), de aproximadamente 6 semanas de edad al comienzo del estudio. Todas las ratas tenían un defecto de 3 mm x 5 mm creado a cada lado de la calvaria. El defecto izquierdo de cada una se trató con un testigo negativo (reemplazo de injerto de hueso HEALOS®, solo) y el defecto derecho de cada uno se trató con un testigo positivo (HEALOS® + BMP-2), un testigo negativo (defecto vacío; se quitó el hueso y no se reemplazó con nada), o células (PDAC™ u OPAC) cargadas sobre la matriz del portador HEALOS®. Se asignaron ocho animales a los grupos de tratamiento celular y se asignaron cuatro animales a grupos de BMP-1 y sin defectos. Los defectos se trataron con Healos que contenía las siguientes dosificaciones: 5 μ g de BMP-2, o 3×10^5 - 4×10^5 células.

Las ratas se sacrificaron siete (7) semanas después de la implantación. Con la necropsia, los cráneos se recolectaron y se colocaron en 10% de formaldehído. Las calvarias se escanearon con PIXI, se sometieron a radiografía y después se descalcificaron para remojo en parafina y seccionamiento. Las secciones histológicas coronales de las calvarias se tiñeron con azul de toluidina y tinción de H&E (hematoxilina y eosina). La cantidad de crecimiento hacia el interior del hueso al defecto se evaluó mediante un sistema de clasificación de 0 a 4, siendo 4 la cantidad más grande.

Detalles de la cirugía

Se adquirieron un total de cuarenta y ocho (48) más cuatro (4) ratas atímicas macho de reserva Hsd:RH-Foxn1^{nu} de Harlan, Indianapolis, en Estados Unidos. Los animales estaban libres de patógeno específico y tenían aproximadamente 6 semanas de edad al momento de la llegada a MDS-PS-Efficacy Pharmacology. Las ratas fueron anestesiadas usando cetamina/xilazina administrada por inyección intraperitoneal, según los procedimientos operativos estándar (SOP). Se logró una anestesia general en aproximadamente 3-5 minutos y se observó mediante una falta de respuesta a un pellizco en el dedo de la pata. La sedación se mantuvo a lo largo de toda la cirugía con isoflurano, según fue necesario.

Se rasuró el área del cráneo usando una cortadora eléctrica y se preparó con alcohol y se restregó con clorhexadina. El animal se posicionó para sujetar con firmeza la cabeza en una posición estable hacia adelante y se administró una inyección anestésica (aproximadamente 0,2 ml de xilocaína) por vía subcutánea en el área central del cráneo entre las orejas. Se realizó una incisión de piel transversal en el sitio de la inyección de xilocaína y un expansor de tejido colocado en la región central del margen rostral de la incisión (colgajo de piel). El expansor abrió la incisión y se expuso el cráneo. La xilocaína, que se vuelve similar a un gel, se quitó y se realizó una incisión transversal en el periostio en la sutura parietal/interparietal usando la hoja del escalpelo. El periostio se quitó de los huesos parietales después de que se realizó la incisión. Se utilizó un taladro Dremel a una velocidad media para esculpir cuidadosamente el margen de ambos defectos, aproximadamente 3 mm por un área de 5 mm en cada hueso parietal, hasta que la parte central del hueso estaba completamente libre de unión. El área se irrigó con un gotero de solución salina estéril durante la perforación para evitar que el hueso se sobrecalentara. Cuando la parte del hueso se separó completamente se quitó con fórceps Adson. Los bordes del defecto se marcaron con cuadrados y se alisaron cuidadosamente usando fórceps cuando fue necesario. Para quitar el polvo y las virutas de hueso, el cráneo se enjuagó con aproximadamente 3 mL de solución salina estéril, que se absorbió con una pieza de gasa

estéril. Una vez limpia y que se quitó el exceso de fluido, el defecto se trató con el artículo de prueba asignado. La dermis se tiró hacia atrás sobre el cráneo y la incisión dérmica se cerró usando suturas Vicryl 3.0 o 4.0. El personal encargado de las instalaciones para animales hizo chequeos post-operatorios para documentar la recuperación completa del animal. El Día 48 post-cirugía, el resto de los animales fueron sacrificados por asfixia con CO₂.

5 *Detalles del análisis*

Se recolectaron las calvarias y se colocaron en 10% de formaldehído. Luego de la fijación, se utilizó una absorciometría de rayos x de energía dual Lunar (PIXI) para determinar la densidad mineral ósea (BMD) de ambos defectos de la calvaria. Se estableció una ROI más pequeña que los márgenes del área de defecto y se utilizó una ROI del mismo tamaño para ambos defectos en todas las muestras. El PIXI midió el área mineral ósea (BMA) PIXI y el contenido mineral óseo (BMC; g). Luego se dividió el BMC por el BMA (mm²) para determinar la densidad mineral ósea por área (BMD; g/mm²). Después de completarse la densitometría de PIXI, las calvarias se sometieron a radiografía y se procesaron para Histología. Las calvarias se sometieron a radiografía, se procesaron a través de procesamiento de tejidos descalcificados y se dividieron en dos piezas. Después de dividirse, las calvarias se empaparon en parafina. Se cortaron tres secciones coronales a través de las áreas de defecto, cada una de aproximadamente 4-6 µm de espesor y se montaron sobre portaobjetos. Se tiñó una sección con azul de toluidina y otra se tiñó con H&E para evaluación histopatológica del crecimiento óseo hacia dentro. La determinación del cierre del defecto usando escaneos de rayos x se realizó designando una región de interés que rodea el efecto craneano, usando umbralización para definir el área radioluciente (defecto residual oscuro) de áreas radio-opacas, cuantificando estas áreas de defecto residual usando un software de formación de imágenes.

20 Los resultados demostraron un 20% de aumento en la formación ósea, como se observa mediante aumentos de BMC y BMD, y mediante tinción de H&E, para OPAC en comparación con PDAC™ en este modelo. En base al análisis de los datos in vivo, las OPAC exhibieron al menos 20% más de formación ósea que PDAC™ mediante análisis histológico (Figura 14) y densitométrico (PIXI). Asimismo, el análisis del área de defecto residual usando escaneos de rayos x obtenidos en el momento del sacrificio, indicó que el 63% de los animales en el grupo de OPAC mostró más de 50% de cierre del defecto en comparación con 38% de los animales en el grupo PDAC (Figura 16).

6.3 Ejemplo 3: Tratamiento de mieloma múltiple usando OPAC

6.3.1 Materiales y métodos

6.3.1.1 *Establecimiento de OPAC transducidas de forma estable con proteína fluorescente verde mejorada (EGFP)*

30 El vector retroviral de pLEGFP que contiene una secuencia de codificación de la Proteína Fluorescente Verde Mejorada (EGFP) (Clontech, Palo Alto, California, Estados Unidos) se utilizó para transfectar transitoriamente la línea celular de envasado Phoenix Eco (ecotrópica) usando SuperFect (QIAGEN Inc., Valencia, California, Estados Unidos). La EGFP es una variante con desplazamiento hacia el rojo de proteína fluorescente verde Aequorea victoria tipo salvaje que ha sido optimizada para una fluorescencia más brillante y mayor expresión en células de mamífero. Los sobrenadantes que contenían partículas retrovirales se recolectaron 24-48 horas después de transfección. Las OPAC se infectaron con las partículas retrovirales en presencia de 8 µg/ml de polibreno durante 12 horas momento en el cual los medios se reemplazaron con medio de cultivo nuevo. En algunos experimentos, las células se expusieron a los sobrenadantes que contenían las partículas virales una vez más antes de que se seleccionaron cultivándolas en presencia de 200-400 µg/ml de G418 durante 2-3 semanas.

6.3.1.2 *Inserción de OPAC en ratones SCID-Rab mielomatosos*

40 Como alternativa al uso de tejido óseo humano en un modelo SCID-hu de mieloma humano primario, se utilizó un sistema en el que los huesos de conejo se implantaron en ratones SCID (ratones SCID-rab), seguido de la introducción de células de mieloma directamente en el hueso implantado. Los ratones mielomatosos SCID-rab se construyeron como se describió anteriormente. Ver Yata, K. y Yaccoby, S., et al, Leukemia 2004;18:1891-1897. Se obtuvieron los ratones CB.17/lcr-SCID (de 6-8 semanas de edad) en Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, Estados Unidos) y conejas preñadas de Nueva Zelanda en Myrtle Rabbitry (Thompson Station, TN, Estados Unidos). Los conejos de 3-4 semanas de edad fueron profundamente anestesiados con una alta dosis de sodio pentobarbital y fueron sacrificados por dislocación cervical. Los fémures y las tibias de los conejos se cortaron en dos pedazos, con los extremos proximales y distales cerrados, mientras que las vértebras se cortaron en pequeños fragmentos (1 x 2 cm²).

50 Para implantación ósea, el lado derecho o izquierdo del ratón SCID se enjuagó con alcohol y se colocó en una botella con una gasa estéril. El hueso del conejo se insertó subcutáneamente a través de una pequeña incisión (5 mm). Luego se cerró la incisión con grapas quirúrgicas estériles, y se hizo posible la inserción de los huesos durante 6-8 semanas. En algunos ratones experimentales, se implantaron dos huesos simultáneamente contralateralmente en el mismo ratón. Para cada experimento, se inyectaron directamente en el hueso de conejo implantado 10-50 x 10⁶ células de la médula ósea de mieloma derivadas de un paciente humano no separadas que contenían 17 +/- 8% células de plasma (PC) o 3,3 +/- 1,6 x 10⁶ PC en 50 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se utilizaron al menos dos ratones para cada experimento. Los ratones fueron desangrados periódicamente de la vena de la cola para medir los cambios en el nivel de inmunoglobulina (Ig) humana en circulación del isotopo de proteína M.

El establecimiento del crecimiento del mieloma se demostró mediante niveles aumentados de inmunoglobulinas monoclonales humanas (hlg) en sueros de ratón, tal como se observa mediante ELISA, y mediante evaluación radiográfica de las lesiones óseas líticas. 5×10^5 OPAC que expresan EGFP se recolectaron con el uso de tripsina-EDTA y se resuspendieron en 50 μ l de PBS. Las OPAC se inyectaron directamente en los huesos implantados en los ratones SCID-rab. Los experimentos continuaron durante 8-16 semanas post-inyección. Los cambios en la densidad mineral ósea (BMD) de los huesos implantados se determinó usando un densitómetro PIXImus DEXA (GE Medical Systems LUNAR, Madison, WI).

6.3.1.3 Inmunohistoquímica de tejido cultivado de ratones SCID/Rab

Las secciones de huesos descalcificados de ratones SCID-rab con mieloma primario fueron desparafinizadas en xileno, rehidratadas con etanol, enjuagadas en PBS y el antígeno se recuperó usando microondas tal como se describió anteriormente (ver Yata, K., supra). Las OPAC cultivadas se tripsinizaron, se prepararon portaobjetos de citospina y se fijaron con 10% de formalina tamponada de fosfato durante 20 min. Después del aplacamiento de peroxidasa con 3% de peróxido de hidrógeno durante 10 min, los portaobjetos se incubaron con anticuerpos monoclonales contra EGFP y CD 166 humano, osteocalcina y BMP-2 (5-10 μ g/ml) durante 30-60 min y se desarrollaron usando un kit de inmunoperoxidasa de Dako y contratiñendo con hematoxilina.

6.3.1.4 Tinción de von Kossa y rojo alizarina

Para detección de la deposición de calcio (tinción von Kossa), las OPAC se fijaron en 10% de formalina tamponada de fosfato durante 10 min. Se agregó 5% de nitrato de plata recién preparado y los especímenes se dejaron en la oscuridad durante 10 min, se enjuagaron con agua destilada y luego se expusieron a luz UV durante 15 min mientras se cubrieron con agua. La reacción se detuvo enjuagando por completo con agua destilada.

6.3.1.5 Análisis estadístico

A menos que se indique lo contrario, todos los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). Se utilizó una prueba t apareada de Student para evaluar el efecto de diferentes condiciones de cultivo en los números de células de mieloma, viabilidad, apoptosis y proliferación, y para evaluar el efecto de las OPACC en el crecimiento del tumor y en la densidad mineral ósea humana (BMD) en ratones SCID-rab.

6.3.1.6 Transducción de OPAC mediada por lentivirus

Todos los lentivirus recombinantes se produjeron mediante transfección transitoria de células 293T de acuerdo con un protocolo estándar. Brevemente, las células 293T se incubaron toda la noche con un precipitado de transfección. Posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó y posteriormente se realizó una incubación durante 2 días más. Los medios de las células transfectadas fueron cultivados, centrifugados a 3.000 rpm a 4°C durante 15 minutos y filtrados a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 μ m. Con el filtrado se recubrió un cojín de 20% de sacarosa y se centrifugó a 26.000 rpm a 4°C durante 100 minutos en una ultracentrifugadora Beckman usando un rotor SW28. Las partículas similares a virus granuladas se suspendieron en DMEM y se almacenaron a -80°C. Las titulaciones de las soluciones concentradas de virus (unidades de titulación [TU]/ml) se determinaron agregando alícuotas de suspensión de virus sobre monocapas de células 293T u otros tipos de células apropiados y evaluando luego el porcentaje de células GFP positivas mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACScan, Becton Dickinson). Se obtuvieron de rutina titulaciones de más 10^9 TU/ml.

Las OPAC se transfectaron con las partículas retrovirales en presencia de 8 μ g/ml de polibreno durante 12 horas momento en el cual los medios se reemplazaron con medio de cultivo nuevo. En algunos experimentos, las células se expusieron a los sobrenadantes que contenían las partículas virales una vez más antes de que se seleccionaron cultivándolas en presencia de 200-400 μ g/ml de G418 durante 2-3 semanas.

6.3.2 Resultados

6.3.2.1 Mineralización de la matriz mediante OPAC

Las OPAC se cultivaron en presencia o ausencia de medios osteogénicos (alfa MEM complementado con 10% de FBS, dexametasona (100 nM), ascorbato (0,05 mM) y beta GP (10 mM) durante aproximadamente 2 semanas. Para detección de deposición de calcio, las células se fijaron en 10% de formalina tamponada de fosfato durante 10 minutos. Las células fijadas se tiñeron con tinte rojo de alizarina. La reacción se detuvo enjuagando por completo con agua destilada. Las OPAC se cultivaron en medios osteogénicos que mostraron signos de mineralización de matriz como se indicó mediante la unión del rojo de alizarina a calcio que se deposita sobre la matriz extracelular producida por las células. La mineralización de la matriz es un marcador de diferenciación osteogénica (no se muestran los datos).

6.3.2.2 Inhibición de OPAC de la maduración de osteoclastos

Experimentos de cocultivo: Utilizando dispositivos Transwell, las OPAC o MSC se cultivaron primero en el reverso de la membrana de inserto con medios osteoblásticos; los precursores de osteoclastos se incubaron entonces en la

cámara superior. Para permitir la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos simultáneamente, los insertos se incubaron entonces con α -MEM complementado con 10% de PBS, RANKL (50 ng/ml), M-CSF (25ng/ml), dexametasona (100 nM), ascorbato (0,05 mM) y β GP (10 mM) durante aproximadamente 2 semanas. Este procedimiento resultó en un crecimiento simultáneo de osteoclastos multinucleados que expresan fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y osteoblastos que expresan fosfato alcalino. Los precursores de osteoclastos cultivados en ausencia de OPAC o células madre mesenquimales produjeron un promedio de 120 osteoclastos (ver Figura 17). Por el contrario, los precursores de osteoclastos produjeron un promedio de 40 osteoclastos cuando se cultivaron en presencia de células madre placentarias y un promedio de 60 osteoclastos cuando se cultivaron en presencia de MSC. Por lo tanto, las OPAC parecen suprimir la formación de osteoclastos más eficazmente que lo hacen las células madre mesenquimales.

El efecto de las OPAC en la diferenciación de osteoclastos se redujo significativamente y se formaron significativamente más osteoclastos, cuando los osteoclastos y las OPAC se cultivaron en presencia de un anticuerpo contra la osteoprotegerina (anti-OPG; $p < 0,04$). Adicionalmente, se formaron significativamente ($p < 0,004$) más osteoclastos cuando las OPAC, solas, se cultivaron con precursores de osteoclastos que cuando los precursores de osteoclastos se cultivaron en presencia de anti-OPG. Por lo tanto, sin ánimo de ceñirse a un mecanismo o teoría en particular, la supresión de la diferenciación de osteoclastos por OPAC parece estar mediada por la osteoprotegerina que secreta OPAC.

6.3.2.3 Supresión del crecimiento de células de mieloma múltiple por las OPAC

Las células de mieloma múltiple se obtuvieron a partir de aspiraciones de médula ósea (BM) heparinizadas de 27 pacientes con mieloma activo durante visitas clínicas programadas. Las muestras de médula ósea se separaron mediante centrifugación de densidad utilizando Ficoll-Paque (gravedad específica 1,077 g/ml) y la porción de células plasmáticas de mieloma múltiple en las fracciones celulares de densidad baja determinada por citometría de flujo CD38/CD45. Las células plasmáticas (PC) se aislaron utilizando la selección de perlas inmunomagnéticas CD138 y el sistema de separación automatizado autoMAC (Miltenyi- Biotec, Auburn, CA). La pureza de las PC se determinó por citometría de flujo CD38/CD45 para ser rutinariamente $>94\%$.

Las OPAC y MSC se trataron bajo condiciones estándar o condiciones osteogénicas y se cocultivaron con células de mieloma múltiple. Para los experimentos de cocultivo se utilizaron insertos Transwell con poros de 1- μ m. En este sistema, los osteoblastos (es decir, las MSC u OPAC cultivadas bajo condiciones osteogénicas), las MSC u OPAC se cultivaron en el reverso de las membranas de insertos y las células de mieloma múltiple (Con MM) se cultivaron en la cámara superior de los insertos. Para el cultivo, los insertos de 6 pocillos se dieron vuelta y colocaron en un plato profundo estéril. Las MSC u OPAC se recogieron con tripsina-EDTA y se resuspendieron en un medio de MSC (aproximadamente $0,5 \times 10^6$ /ml). Aproximadamente 600 μ l de células se colocaron en el centro del inserto invertido. El plato se cubrió entonces con Parafilm y se colocó en la incubadora durante 1 hora, permitiendo que las células se adhirieran a la membrana. Después de la incubación, los insertos se dieron vuelta y se colocaron en pocillos de 6 placas. Cuando las MSC u OPAC fueron aproximadamente 80% confluentes, se cultivaron con un medio de MSC o con un medio osteoblástico durante 2-3 semanas. La viabilidad de las células de mieloma múltiple se evaluó utilizando un ensayo MTT después de 72 horas. El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico para medir la actividad de enzimas que reducen el MTT a formazán, proporcionando un color púrpura. Esta reducción se lleva a cabo sólo cuando las enzimas de reductasa mitocondrial están activas y por lo tanto la conversión se utiliza a menudo como una medición de células viables.

Los resultados muestran que las OPAC no diferenciadas inhibieron la viabilidad de las células Con MM en aproximadamente 70% mientras las MSC sólo inhibieron la viabilidad de Con MM en aproximadamente 40% (ver FIG. 18). Bajo condiciones osteogénicas las OPAC inhibieron la viabilidad de las células Con MM aun más que bajo condiciones no osteogénicas; las MSC también mostraron más inhibición bajo condiciones osteogénicas, aunque no el mismo nivel que las OPAC (ver FIG. 18).

Las OPAC también se evaluaron para su capacidad de suprimir la proliferación de las líneas celulares de mieloma múltiple en comparación con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea fetal (FB MSC) en un ambiente de cocultivo que permitió el contacto de célula-célula. Las OPAC (10.000 células/pocillo) se cultivaron con líneas celulares de mieloma múltiple BN y JB (ver Li et al, Br. J. Haematology 138(6): 802-811 (2007)), ARP1 (línea celular derivada de mieloma múltiple IgA sensible a dexametasona), U266 (una línea celular plasmática que produce IgE), Dn y Hale (10.000 células/pocillo), todos los cuales expresaron luciferasa, durante 7 días en un medio RPMI que comprende 10% de suero bovino fetal y antibióticos. El crecimiento de células de mieloma múltiple se evaluó mediante la detección de actividad de la luciferasa. Las OPAC suprimieron el crecimiento de las líneas celulares de mieloma múltiple aproximadamente de la siguiente manera: BN (0,4); JB (0,5); ARP1 (0,15); U266 (0,28); Dn (0,32); y hale (0,75), en donde el número en paréntesis indica el crecimiento de las líneas celulares MM en veces del crecimiento de las líneas celulares MM cocultivadas con FB-MS.

En un experimento adicional, las células de mieloma múltiple de seis pacientes humanos diferentes se obtuvieron y cocultivaron a 400.000 células/pocillo con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea fetal u OPAC durante 6-10 días. La viabilidad de las células de mieloma múltiple se redujo significativamente en presencia de las OPAC en comparación con MSC fetales ($p < 0,03$).

6.3.2.4 Biodistribución de OPAC etiquetadas, administradas intralesionalmente en animales

Este ejemplo demuestra la biodistribución de OPAC transfectadas en ratones. Las OPAC se transfectaron con un reportero luciferasa. El vector retroviral pLEGFP que contiene el EGFP (Clontech, Palo Alto, California, Estados Unidos) se utilizó para transfectar transitoriamente la línea celular de envasado Phoenix Eco utilizando SuperFect (QIAGEN Inc., Valencia, California, Estados Unidos). Los supernadantes que contienen partículas retrovirales se recogieron 24-48 horas después de la transfección. Las OPAC se transfectaron con las partículas retrovirales en presencia de 8 µg/ml de polibreno durante 12 horas, momento en el cual el medio se reemplazó con un medio de cultivo nuevo. En algunos experimentos, las células se expusieron una vez más a los supernadantes que contienen las partículas virales antes de seleccionarlos mediante su cultivo en presencia de 200-400 µg/ml de G418 durante 2-3 semanas.

Los animales SCID-rab se implantaron con hueso de conejo como se describió anteriormente. Los animales que tienen un hueso que muestra lesiones progresivas se inyectaron con células etiquetadas (1×10^6 células) directamente en las lesiones. La biodistribución de las OPAC en los ratones se monitoreó mediante imágenes de bioluminiscencia, una herramienta en tiempo real, no invasiva, en diferentes puntos de tiempo. Las OPAC que expresan EGFP pudieron detectarse en los ratones a las 2 semanas y 5 semanas después de la infección en áreas donde el hueso exógeno se implantó en los animales SCID-rab (los datos no se muestran).

6.3.2.5 Las OPAC aumentan la densidad mineral ósea en ratones SCID-rab mielomatosos primarios

Los ratones SCID-rab mielomatosos primarios se construyeron según se describió anteriormente. Tras el establecimiento del crecimiento del mieloma según se evaluó mediante el nivel aumentado de inmunoglobulinas monoclonales humanas (Mg) en los sueros de ratones utilizando ELISA y mediante evaluación radiográfica de lesiones óseas líticas, se recogieron 1×10^6 de OPAC que expresan EGFP con el uso de tripsina-EDTA y resuspendieron en 100 µl de PBS. Las OPAC y PBS se inyectaron directamente en los huesos implantados, que comprenden lesiones mielomatosas. Los cambios en la densidad mineral ósea (BMD) de los huesos implantados se determinaron utilizando un PIXImus DEXA (GE Medical Systems LUNAR, Madison, WI) en intervalos de 5 semanas durante 8-16 semanas después de la inyección. Se encontró que las OPAC administradas intralesionalmente aumentaron la densidad mineral ósea (BMD) del hueso implantado en comparación con testigos en los cuales sólo se inyectó el medio, ($p = 0,0006$.) (Ver Figura 19).

6.3.2.6 Las OPAC aumentan la masa ósea en huesos afectados por mieloma múltiple

Los ratones SCID-rab mielomatosos construidos según se describió anteriormente se inyectaron con células de mieloma primario de un paciente humano. Después del desarrollo de lesiones osteolíticas según se demostró mediante el nivel aumentado de inmunoglobulinas monoclonales humanas (hlg) en los sueros de ratones, según se evaluó por ELISA y mediante evaluación radiográfica de lesiones óseas líticas, se administraron $5 - 10 \times 10^5$ de OPAC que expresan EGFP según se describió en el ejemplo previo. Los experimentos se continuaron durante 8-16 semanas después de la inyección. El nivel de células de mieloma humano se determinó utilizando inmunoglobulinas monoclonales humanas (hlg) en los sueros de ratones mediante un ensayo ELISA después de la inyección de las OPAC (ver Figura 20). Los cambios en la densidad mineral ósea (BMD) de los huesos implantados se determinaron utilizando un PIXImus DEXa (BE Medical Systems LUNAR, Madison, WI). Durante el transcurso del estudio, los huesos implantados en ratones mielomatosos que reciben OPAC administradas intralesionalmente mostraron un aumento significativo ($0,10 \text{ gm/cm}^2$) en masa ósea 35 días después de la inyección en comparación con ratones que recibieron sólo solución amortiguadora ($p = 0,006$).

6.3.2.7 Las OPAC inhiben la destrucción ósea en animales SCID-Rab a los que se les administró una línea celular de mieloma múltiple agresivo

Los ratones SCID-rab mielomatosos se construyeron según se describió anteriormente. Tras el establecimiento de mieloma utilizando una línea celular de mieloma BN agresiva (una línea celular no hiperdiploide aislada de un paciente humano), el efecto de la solución amortiguadora u OPAC en el crecimiento de las células de mieloma se evaluó mediante el nivel aumentado de inmunoglobulinas monoclonales humanas (hlg) en los sueros de ratones utilizando ELISA y mediante una evaluación radiográfica de lesiones óseas líticas. Se recogieron $0,5 \times 10^6$ de OPAC que expresan EGFP ($0,5 \times 10^6$ células) con el uso de tripsina-EDTA y resuspendieron en 50 µl de PBS. Las OPAC y PBS se inyectaron directamente en los huesos implantados en ratones SCID-rab. Los experimentos se continuaron durante 8-16 semanas después de la inyección. Los cambios en la densidad mineral ósea (BMD) de los huesos implantados se determinaron utilizando un PIXImus DEXA (GE Medical Systems LUNAR, Madison, WI). Los datos muestran que las OPAC inhibieron la pérdida ósea que sería atribuible a esta línea celular de mieloma múltiple agresiva según se midió mediante densidad mineral ósea (BMD) y contenido mineral óseo (BMC). Ver Figura 21.

La reducción/eliminación de la pérdida de masa ósea debido a las OPAC se confirmó mediante radiografía de rayos X (los datos no se muestran). Los animales tratados con OPAC tenían masa ósea más alta en comparación con animales testigo según se demostró mediante un aumento significativo en las áreas radiodensas del hueso nuevo.

6.4 Ejemplo 4: Tratamiento del mieloma múltiple utilizando OPAC en combinación con melfalán

Este ejemplo demuestra la eficacia de la administración de OPAC en combinación con melfalán para tratar lesiones osteolíticas asociadas con mieloma múltiple. Los ratones SCID-rab mielomatosos se implantaron con hueso según se describió en la Sección 6.3.1.2 previa. Los ratones se separaron en grupos que reciben OPAC, a una dosis de aproximadamente 1 millón en solución salina tamponada con fosfato y testigos que reciben no OPAC. Los ratones se inyectaron en la semana cero con una línea celular de mieloma múltiple (BN) que expresa EGFP/Luciferasa, directamente en el hueso implantado y tratado con 10 mg/kg de melfalán subcutáneamente dos veces a la semana durante cuatro semanas, comenzando en la semana 3 (semanas 3-7 después de la inyección de células de mieloma). En la semana 7, el tratamiento con melfalán se discontinuó y se inyectó aproximadamente 1 millón de células/ratón OPAC sin etiquetar intralesionalmente en el hueso implantado. La evolución de la enfermedad se siguió por once semanas adicionales. La formación de imágenes de animales vivos se realizó en las semanas 3, 7 y 18. Los ratones que recibieron OPAC mostraron una carga de células tumorales de mieloma múltiple reducido, según quedó demostrado por EGFP y fluorescencia de luciferasa, en comparación con testigos. Más aun, los ratones que recibieron OPAC retuvieron la masa ósea mejor que los ratones testigo, mostrando un aumento de aproximadamente 28% en masa ósea después del melfalán en comparación con una pérdida de aproximadamente 4% después del melfalán para los ratones testigo.

6.5 Ejemplo 5: Producción del producto de OPAC criopreservadas y banco de células

Este ejemplo demuestra la producción de un producto a base de OPAC congeladas.

Criopreservación: Las OPAC se obtienen según se describió en el Ejemplo 1. Las células a congelar se cosechan del cultivo con Tripsina-EDTA, se extraen con 2% de FBS en PBS y se cuentan en un hemocitómetro. Después de la centrifugación, las células se resuspenden con 10% de DMSO en FBS a una concentración de aproximadamente 1 millón de células/ml para células a utilizar para ensamblar un banco de células y 10 millones de células/ml para dosis de células congeladas. La solución de células se transfiere a un recipiente de congelamiento, que se coloca en un baño de alcohol isopropílico en un congelador a -80°C. Al día siguiente, las células se transfieren a nitrógeno líquido.

6.5.1 Diseño de un banco de OPAC

Un "lote" se define como todas las dosis de células derivadas a partir de un corion de un solo donante. Las células mantuvieron un crecimiento normal, cariotipo y fenotipo de marcador de superficie celular para más de 8 pases y 30 duplicaciones durante el cultivo de expansión. Dada esta limitación, las dosis comprenden células de 5 pases y aproximadamente 20 duplicaciones. Para generar un suministro de células equivalentes, un único lote se expande en cultivo y se almacena en un banco de células de dos niveles y dosis congeladas. En particular, las células cosechadas del cultivo primario, que se define como células de Pase 0 habiéndose sometido a 0 duplicaciones, se utilizan para iniciar un cultivo de expansión. Después del primer pase, ocurren aproximadamente 4 duplicaciones y las células se congelan en un banco de células primario (MCB). Los viales del MCB se utilizan para sembrar cultivos de expansión adicionales. Después de que dos pases adicionales de células se diluyeron del MCB, las células se congelaron en un banco de células de trabajo (WCB), aproximadamente 12 duplicaciones acumulativas. Los viales del WCB se utilizan para sembrar un cultivo de expansión para otros 2 pases, resultando en células de pase 5 a aproximadamente 20 duplicaciones que se congelan en dosis individuales.

6.5.2 Células de descongelamiento para cultivo

Los recipientes congelados de células se colocan en una bolsa de plástico sellada y se sumergen en un baño de agua a 37°C. Los recipientes se agitan en círculos suavemente hasta que todos los contenidos se derriten excepto para una pieza pequeña de hielo. Los recipientes se retiran de la bolsa de plástico sellada y un volumen de 10X de medio de cultivo se agrega lentamente a las células con un mezclador suave. Una muestra se cuenta en el hemocitómetro y se siembra en cultivos de expansión.

6.5.3 Células de descongelamiento para inyección

Los recipientes congelados de células se transfieren al sitio de administración en un transportador de nitrógeno seco. Antes de la administración, los recipientes se colocan en una bolsa de plástico sellada y se sumergen en un baño de agua a 37°C. Los recipientes se agitan en círculos suavemente hasta que todos los contenidos se derriten excepto para una pieza pequeña de hielo. Los recipientes se retiran de la bolsa de plástico sellada y se agrega un volumen igual de 2,5% de HSA/5% de Dextrano. Las células se inyectan sin un lavado adicional.

6.5.4 Prueba y especificaciones

Una muestra de sangre materna acompaña la placenta de todos los donantes. La muestra se somete a una prueba para la detección del anticuerpo del núcleo de Hepatitis B y antígeno de superficie, anticuerpo del virus de Hepatitis C y ácido nucleico y anticuerpo de VIH I y II y ácido nucleico. El procesamiento placentario y de cultivo primario comienza antes de la muestra de los resultados de prueba, pero continúa sólo para placentas asociadas con muestras de sangre materna que resultan negativas para todos los virus. Un lote se rechaza si el donante da positivo para cualquier patógeno. Además, las pruebas descritas en la Tabla 3 se realizan en el MCB, el WCB y una

muestra del material de dosis celular derivado de un vial del WCB. Un lote se libera sólo cuando se cumplen todas las especificaciones.

Tabla 3: Prueba y especificaciones de células

Prueba	Métodos	Resultado requerido
Esterilidad	BD BACTEC PEDS PLUS/F y BACTEC Myco/F Lytic	Negativo
Endotoxina	Coágulo de gel LAL	≤ 5 EU/ml*
Viabilidad	Azul de tripano	>70% viable
Micoplasma	Cultivo directo, ADN-fluorocromo (FDA PTC 1993)	Negativo
Identidad	Citometría de flujo	CB105 ⁺ ; CD200 ^{intenué} CD200 ⁻
Pureza celular	Microsatélite	No se detectó célula contaminante
Cariotipo	Bandeo cromosómico y conteo de cromosomas en células metafase	Normal

*Para que el producto diseñado sea de 40 ml de células congeladas/dosis y un máximo de 5 EU/ml, el producto de células se encuentra por debajo del límite superior de 5EU/kg/dosis para recipientes mayores que 40 kg en peso corporal.

5 6.6 Ejemplo 6: Tratamiento de mieloma múltiple por la administración de OPAC

6.6.1 Administración intralesional de OPAC en solución

10 Un individuo presenta mieloma múltiple, con síntomas de dolor óseo e hipercalcemia (en este caso, niveles de calcio en sangre de entre 3 y 4 mmol/L). Las imágenes de rayos X confirman la presencia de lesiones múltiples en la tibia, peroné, radio y cúbito. De aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 de OPAC en 1,0-2,0 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) por lesión se administran al individuo mediante inyección directamente en la lesión. El individuo se evalúa cada dos semanas luego de la inyección por rayos X para determinar el alcance de las lesiones óseas y niveles de calcio en sangre se evalúan cada semana hasta que las lesiones óseas se reducen visiblemente mediante rayos X o niveles de calcio en sangre se reducen de manera detectable. Las OPAC se vuelven a administrar opcionalmente dentro de las cuatro semanas de la administración inicial.

15 6.6.2 Administración intralesional de OPAC en gel de colágeno

20 Un individuo presenta mieloma múltiple, con síntomas de dolor óseo e hipercalcemia (en este caso, niveles de calcio en sangre de entre 3 y 4 mmol/L). Las imágenes de rayos X confirman la presencia de lesiones múltiples en la tibia, peroné, radio y cúbito. De aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 de OPAC en 1,0-2,0 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que comprende suficiente colágeno para formar un gel inyectable por lesión se administran al individuo mediante inyección directamente en la lesión. El individuo se evalúa cada dos semanas luego de la inyección por rayos X para determinar el alcance de las lesiones óseas y los niveles de calcio en sangre se evalúan cada semana hasta que las lesiones óseas se reducen visiblemente mediante rayos X o los niveles de calcio en sangre se reducen a 3 mmol/L o menos. Las OPAC se vuelven a administrar opcionalmente dentro de las cuatro semanas posteriores a la administración inicial.

25 6.6.3 Administración intralesional de OPAC con reemplazo de injerto óseo

30 Un individuo presenta mieloma múltiple, con síntomas de dolor óseo e hipercalcemia (en este caso, niveles de calcio en sangre de entre 3 y 4 mmol/L). Las imágenes de rayos X confirman la presencia de lesiones múltiples en la tibia, peroné, radio y cúbito. En el consultorio, se premezcla un sustituto de injerto óseo inyectable (por ejemplo, HEALOS®) con aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 de OPAC, en 1,0-2,0 mL de solución salina de fosfato (PBS), luego se inyecta en el individuo en el sitio de las lesiones. El individuo se evalúa cada dos semanas luego de la inyección por rayos X para determinar el alcance de las lesiones óseas y los niveles de calcio en sangre se evalúan cada semana hasta que las lesiones óseas se reducen visiblemente mediante rayos X o los niveles de calcio en sangre se reducen a 3 mmol/L o menos. Las OPAC se vuelven a administrar opcionalmente dentro de las cuatro semanas posteriores a la administración inicial.

35 6.6.4 Administración intravenosa de OPAC

40 Un individuo presenta mieloma múltiple, con síntomas de dolor óseo e hipercalcemia (en este caso, niveles de calcio en sangre de entre 3 y 4 mmol/L). Las imágenes de rayos X confirman la presencia de lesiones múltiples en la tibia, peroné, radio y cúbito. De aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{10} de OPAC, en aproximadamente 750 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), se administran al individuo mediante infusión intravenosa. El individuo se evalúa cada dos semanas luego de la inyección por rayos X para determinar el alcance de las lesiones óseas y los niveles de calcio en sangre se evalúan cada semana hasta que las lesiones óseas se reducen

visiblemente mediante rayos X o los niveles de calcio en sangre se reducen a 3 mmol/L o menos. Las OPAC se vuelven a administrar opcionalmente dentro de las cuatro semanas posteriores a la administración inicial.

La solicitud divulga entre otros los siguientes ítemes:

5 1. Un método de tratamiento de un individuo que padece mieloma múltiple, que comprende administrar a dicho individuo células adherentes placentarias osteogénicas (OPAC) aisladas, en donde dichas OPAC se obtienen de corion y son adherentes al plástico para cultivo tisular, y en donde dichas OPAC son negativas para CD200 o son CD200^{tenue}, y positivas para CD105, y en donde dicha administración reduce notoriamente el avance, detiene el avance o mejora uno o más síntomas de dicho mieloma múltiple.

2. El método del ítem 1, en donde dichas OPAC son SSEA3⁺ o SSEA4⁺.

10 3. El método del ítem 1, en donde dichas OPAC son SSEA3⁺ y SSEA4⁺.

4. El método del ítem 1, en donde dichas OPAC:

15 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺ adherentes, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de BMP3 (proteína morfogenética ósea 3) CDH11, COL10A1, COL14A1, COL15A1, DMP1 (fosfoproteína ácida de la matriz de la dentina 1), DSPP (sialofosfoproteína de la dentina), ENAM (enamelina), FGFR2 (receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos), MMP10 (metaloproteasa de la matriz 10 (estromelina 2)), TGFB3 y/o TGFBR1 cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias CD200⁺ se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real;

20 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias adherentes CD200⁺, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de AMBN (ameloblastina (proteína de la matriz del esmalte)), BMP2 (proteína morfogenética ósea 2), CALCR (receptor de calcitonina), CDH11, COL11A1, COL14A1, COL15A1, COL2A1, CSF2, CSF3, DMP1, DSPP, ENAM, FGF3, GDF10 (factor 10 de diferenciación de crecimiento), IGF1 (factor 1 de crecimiento similar a la insulina), ITGA1 (integrina, alfa 1 (CD49)), ITGA2 (integrina, alfa 2 (CD49B)), MMP10, MMP8 (metaloproteasa de la matriz 8 (colagenasa de neutrófilos)),
25 MMP9, PDGFA (factor de crecimiento A derivado de plaquetas), SMAD1, TGFB3, TGFBR1 y/o TGFBR2 (factor de transformación de crecimiento beta, receptor 2) cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real;

30 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺ adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de CDH11, COL14A1, COL15A1, DMP1, DSPP, ENAM, MMP10, TGFB3 y/o TGFBR1, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real;

35 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺ adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AHSG (glicoproteína alfa-2-HS), ALPL (fosfatasa alcalina de hígado/hueso/riñón), EGF (factor de crecimiento epidérmico), FLT1 (tirosina quinasa 1 relacionada con fms (factor de crecimiento endotelial vascular/receptor del factor de permeabilidad vascular)), IGF2, ITGA2, ITGAM (integrina, alfa M (subunidad 3 del receptor del componente 3 del complemento)), SCARB1 (receptor depurador clase B, miembro 1), SOX9 (SRY (región de determinación sexual Y)-caja 9), TNF, TWIST1 (homólogo 1 de Twist; anteriormente blefarofimosis, epicanto inverso y ptosis 3, acrocefalosindactilia 3), VCAM1 (molécula 1 de adhesión celular vascular 1) y/o VDR (receptor de vitamina D (1,25-dihidroxitamina D3)) cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real;

45 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺ adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BGN (biglicano), COL11A1, COMP (proteína oligomérica de la matriz del cartilago) FGF1 y/o VCAM1 cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real;

50 expresan VCAM1 a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre placentarias adherentes que no son trofoblastos ni citotrofoblastos, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real;

55 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de BMP4, CALCR, CD36, CDH11, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL3A1, COL5A1, DMP1, DSPP, FLT1, MSX1, PDGFA,

TGFB3, TGFBR1 y/o TUFT1 (Tuftelina 1), cuando las OPAC y las células madre se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real;

5 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AMBN, CALCR, COL14A1, COL15A1, CSF3, DMP1, DSPP, ITGA1, ITGA2, MMP10, MMP9, MSX1, PDGFA, TGFB1, TGFB3, TGFBR1 y/o TGFBR2, cuando las OPAC y las células madre mesenquimales se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real;

10 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de CALCR, COL14A1, COL15A1, DMP1, DSPP, MSX1, PDGFA, TGFB3 y/o TGFBR1, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real;

15 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de ALPL, BGLAP (proteína (gla) ósea gamma-carboxiglutamato), IGF2, ITGA2, ITGAM, SCARB1 y/o SOX1, cuando las OPAC y las células madre mesenquimales se cultivan en un medio de crecimiento, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real;

20 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de AHSG, ALPL, BGLAP, BGN, BMP3, BMP5, CD36, COL10A1, COL11A1, COL12A1, COL2A1, COL4A3, COMP, EGF, FGF1, FGFR2, IGE2, MMP8, PHEX (homólogo de la endopeptidasa reguladora de fosfato, ligada a X), RUNX2 (factor de transcripción 2 relacionado con Runt), SCARB1, SOX1, VCAM1 y/o VEGFB, cuando las OPAC y las células madre se cultivan en un medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real; o

25 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más bajo que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más o todos de ALPL, BGLAP, IGF2, SCARB1 y/o SOX9, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en un medio de crecimiento o medio osteogénico, según se evalúa mediante valores Ct de PCR cuantitativa en tiempo real.

5. El método del ítem 1, en donde dichas OPAC:

30 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de BMP4, BMP6, CD36, CDH11, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL3A1, COLSA1, CSF2, CTSK, FGF2, FGFR1, FLT1, ITGA1, MINPP1, MMP9, MSX1, PDGFA, SERPINH1, TGFB3 y TGFBR1, en donde dichas OPAC y dichas células mesenquimales han experimentado un número equivalentes de pases; o

35 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células fibroblastos, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de BMP4, BMP6, CDH11, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL3A1, COL5A1, FLT1, IGF1R, ITGA1, MINPP1, PDGFA, SERPINH1, SMAD3, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TNF, TUFT1, VCAM1 y VEGFA, y en donde dichas células fibroblastos han experimentado un número equivalentes de pases.

40 6. El método del ítem 1, en donde dichas OPAC secretan una o más de las proteínas decorina, epiregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, Proteína de unión a TGF-beta latente 1 (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 o TIMP-2.

45 7. El método del ítem 1, en donde dichas OPAC secretan las proteínas decorina, epiregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, Proteína de unión a TGF-beta latente 1 (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 and TIMP-2

8. El método del ítem 1, en donde dichos uno o más síntomas son dolor óseo, lesiones osteocíticas, anemia, o insuficiencia renal.

9. El método del ítem 1, que comprende administrar al menos 1×10^8 OPAC/kg a dicho individuo.

50 10. Una célula adherente placentaria osteogénica (OPAC) aislada, en donde dicha célula se obtiene a partir de corion, y es adherente a plástico de cultivo de tejidos, y en donde dicha célula es negativa para CD200 o es CD200^{leñue} y positiva para CD105.

11. La célula aislada del ítem 9 que es SSEA3+ o SSEA4+.

12. La célula aislada del ítem 9 que es SSEA3+ y SSEA4+.

13. La célula aislada del ítem 9, en donde dicha célula produce osteoprotegerina.

14. La célula aislada del ítem 9, en donde dicha célula es adicionalmente negativa para expresión de actina de músculo liso- α , negativa para expresión de RANKL, positiva para expresión de NG2, positiva para expresión de osteoprotegerina, o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible.

5 15. La célula aislada del ítem 13, en donde dicha célula es adicionalmente negativa para expresión de actina de músculo liso- α , negativa para expresión de RANKL, positiva para expresión de NG2, positiva para expresión de osteoprotegerina, o exhibe actividad de fosfatasa alcalina inducible.

16. La célula aislada del ítem 9, en donde dicha célula:

10 expresa uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que una célula madre placentaria adherente CD200⁺, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de BMP6, CDH11, COL10A1, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A3, COL5A1, CSF3, CTSK, IGF1R, MINPP1, MMP2, MMP9, MSX1, SMAD1, SMAD3, TGFB3, TGFBR1 y VEGFB, en donde dicha OPAC y dicha célula madre placentaria adherente CD200⁺ se han sometido a un número equivalente de pases;

15 expresa uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que una célula madre mesenquimal derivadas de médula ósea, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de BMP4, BMP6, CD36, CDH11, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL3A1, COL5A1, CSF2, CTSK, FGF2, FC3FR1, FLT1, ITGA1, MINPP1, MMP9, MSX1, PDGFA, SERPINH1, TGFB3 and TGFBR1, en donde dichas OPAC y dicha célula madre mesenquimal han experimentado un número equivalentes de pases; y/o

20 expresa uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que una célula fibroblasto, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de BMP4, BMP6, CDH11, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL3A1, COL5A1, FLT1, IGF1R, ITGA1, MINPP1, PDGFA, SERPINH1, SMAD3, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TNF, TUFT1, VCAM1 y VEGFA, en donde dicha célula fibroblasto ha experimentado un número de pases en cultivo que es equivalente al número de pases que ha experimentado dicha célula fibroblasto.

25 17. La célula aislada del ítem 9, en donde dicha célula secreta una o más de las proteínas decorina, epiregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, Proteína de unión a TGF-beta latente 1 (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 o TIMP-2.

18. La célula aislada del ítem 16, en donde dicha célula secreta las proteínas decorina, epiregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, Proteína de unión a TGF-beta latente 1 (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 y TIMP-2.

30 19. Una población aislada de células que comprende las células del ítem 9.

20. La población aislada de células del ítem 9, en donde dicha células:

35 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias adherentes CD200⁺, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de BMP3 (proteína morfogénica ósea 3), CDH11, COL10A1, COL14A1, COL15A1, DMP1 (fosfoproteína ácida de la matriz de dentina 1), DSPP (sialofosfoproteína de dentina), ENAM (enamelina), FGFR2 (receptor 2 de factor de crecimiento de fibroblastos), MMP10 (metaloproteasa 10 de la matriz (estromelina 2)), TGFB3, y/o TGFBR1, cuando dichas OPACs y dichas células madre placentarias CD200⁺ se cultivan en medio de crecimiento, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real;

40 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias adherentes CD200⁺, en donde dicho gen o genes comprenden uno o más de AMBN (ameloblastina (proteína de la matriz del esmalte)), BMP2 (proteína morfogénica ósea 2), CALCR (receptor de calcitonina), CDH11, COL11A1, COL14A1, COL15A1, COL2A1, CSF2, CSF3, DMP1, DSPP, ENAM, FGF3, GDF10 (factor 10 de diferenciación del crecimiento), IGF1 (factor 1 de crecimiento similar a insulina), ITGA1 (integrina, alfa 1 (CD49)), ITGA2 (integrina, alfa 2 (CD49B)), MMP10, MMP8 (metaloproteasa 8 de la matriz (colagenasa de neutrófilos)), 45 MMP9, PDGFA (factor A de crecimiento derivado de plaquetas), SMAD1, TGFB3, TGFBR1 y/o TGFBR2 (receptor 2 del factor beta de crecimiento transformante) cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en medio osteogénico, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real;

50 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre placentarias adherentes que no son trofoblastos o citotrofoblastos, en donde dicho uno o más genes comprenden uno o más, o todos, de CDH11, COL14A1, COL15A1, DMP1, DSPP, ENAM, MMP10, TGFB3 y/o TGFBR1 independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en medio de crecimiento o medio osteogénico, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real;

expresan uno o más genes a un nivel notoriamente lower level que un número equivalente de células madre placentarias adherentes CD200⁺ que no son trofoblastos o citotrofoblastos, en donde dicho uno o más genes

- comprenden uno o más, o todos, de AHSG (alfa-2-HS-glicoproteína), ALPL (fosfatasa alcalina hígado/hueso/riñón), EGF (factor de crecimiento epidérmico), FLT1 (tirosina quinasa 1 relacionada con fms (receptor de factor de crecimiento endotelial vascular/factor de permeabilidad vascular)), IGF2, ITGA2, ITGAM (integrin, alfa M (subunidad del receptor 3 del componente 3 del complemento)), SCARB1 (miembro 1 de la clase B de receptor depurador),
- 5 SOX9 (SRY (región determinante del sexo Y)-caja 9), TNF, TWIST1 (homólogo 1 de Twist; anteriormente blefarofimosis, epicanthus inversus y ptosis 3, acrocefalosindactilia 3), VCAM1 (molécula 1 de adhesión celular vascular) y/o VDR (receptor de vitamina D (1,25-dihidroxitamina D3)) cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en medio de crecimiento, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real;
- 10 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente menor que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺ adherentes que no son trofoblastos o citotrofoblastos, en donde dicho uno o más genes comprenden uno o más, o todos, de BGN (biglicano), COL11A1, COMP (proteína de la matriz oligomérica del cartílago), FGF1 y/o VCAM1 cuando dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en medio osteogénico, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real;
- 15 expresan VCAM1 a un nivel notoriamente menor que un número equivalente de células madre placentarias CD200⁺ adherentes que no son trofoblastos o citotrofoblastos, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en medio de crecimiento o medio osteogénico, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real;
- 20 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho uno o más genes comprenden uno o más, o todos, de BMP4, CALCR, CD36, CDH11, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL3A1, COL5A1, DMP1, DSPP, FLT1, MSX1, PDGFA, TGFB3, TGFBR1 y/o TUFT1 (Tuftelina 1), cuando las OPAC y las células madre se cultivan en medio de crecimiento, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real;
- 25 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho uno o más genes comprenden uno o más, o todos, de AMBN, CALCR, COL14A1, COL15A1, CSF3, DMP1, DSPP, ITGA1, ITGA2, MMP10, MMP9, MSX1, PDGFA, TGFB1, TGFB3, TGFBR1 y/o TGFBR2, cuando las OPAC y las células madre se cultivan en medio osteogénico, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real;
- 30 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho uno o más genes comprenden uno o más, o todos, de CALCR, COL14A1, COL15A1, DMP1, DSPP, MSX1, PDGFA, TGFB3 y/o TGFBR1 independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en medio de crecimiento o medio osteogénico como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real;
- 35 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente menor que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho uno o más genes comprenden uno o más, o todos, de ALPL, BGLAP (bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein), IGF2, ITGA2, ITGAM, SCARB1 y/o SOX1, when the OPACs and mesenchymal stem cells are cultured in growth medium, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real;
- 40 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente menor que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho uno o más genes comprenden uno o más, o todos, de AHSG, ALPL, BGLAP, BGN, BMP3, BMP5, CD36, COL10A1, COL11A1, COL12A1, COL2A1, COL4A3, COMP, EGF, FGF1, FGFR2, IGF2, MMP8, PHEX (homólogo de endopeptidasa que regula el fosfato, X-unido), RUNX2 (factor 2 de transcripción relacionado con Runt), SCARB1, SOX1, VCAM1 y/o VEGFB, cuando las OPAC y las células madre se cultivan en medio osteogénico, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo
- 45 real; or
- 50 expresan uno o más genes a un nivel notoriamente menor que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho uno o más genes comprenden uno o más, o todos, de ALPL, BGLAP, IGF2, SCARB1 y/o SOX9, independientemente de si dichas OPAC y dichas células madre placentarias se cultivan en medio de crecimiento o medio osteogénico, como se estima por los valores Ct de la PCR cuantitativa en tiempo real.
21. La población aislada de células del ítem 18, donde las células en dicha población de células expresan una o más de las proteínas decorina, epiregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, Proteína de unión a TGF-beta latente I (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 o TIMP-2,
- 55 22. La población aislada de células del ítem 18, donde las células en dicha población de células expresan las proteínas decorina, epiregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, Proteína de unión a TGF-beta latente 1 (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 y TIMP-2.

ES 2 552 556 T3

23. La población aislada de células del ítem 18, en donde al menos 50% de las células de dicha población son las células del ítem 9.
24. La población aislada de células del ítem 18, en donde al menos 80% de las células de dicha población son las células del ítem 9,
- 5 25. La población aislada de células del ítem 18, en donde al menos 95% de las células de dicha población son las células del ítem 9.
26. La población aislada de células del ítem 18 que consiste esencialmente en las células del ítem 9.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso en un método de tratamiento de defectos óseos en un sujeto por administración de dichas células a dicho sujeto, en donde dichas células se obtienen a partir de corion, y son adherentes a plástico de cultivo de tejidos, y en donde dichas células son negativas para CD200 o son CD200^{tenue}, y positivas para CD105.
- 2.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células son SSEA3⁻ o SSEA4⁺, o en donde dichas células son SSEA3⁺ y SSEA4⁺.
- 3.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso según la reivindicación 1, en donde dichas células:
- 10 **exesan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, en donde dicho uno o más genes comprenden uno o más de BMP4, BMP6, CD36, CDH11, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL3A1, COL5A1, CSF2, CTSK, FGF2, FGFR1, FLT1, ITGA1, MINPP1, MMP9, MSX1, PDGFA, SERPINH1, TGFB3 y TGFBR1, en donde dichas células y dichas células madre mesenquimales han experimentado un número equivalente de pases; o**
- 15 **exesan uno o más genes a un nivel notoriamente más alto que un número equivalente de células fibroblastos, en donde dicho uno o más genes comprenden uno o más de BMP4, BMP6, CDH11, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL3A1, COL5A1, FLT1, IGF1R, ITGA1, MINPP1, PDGFA, SERPINH1, SMAD3, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TNF, TUFT1, VCAM1 y VEGFA, y en donde dichas células y dichas células fibroblastos han experimentado un número equivalente de pases.**
- 20 **4.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células:
- secretan una o más de las proteínas decorina, epiregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, proteína 1 de unión a TGF-beta latente (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 o TIMP-2; o
- 25 secretan las proteínas decorina, epiregulina, IGFBP-3, IGFBP-6, IL-2 R alfa, IL-17RC, IL-27, proteína 1 de unión a TGF-beta latente (LTBP), NCAM-1, Smad4, TFPI, TGF-beta R1/ALK5 y TIMP-2.
- 5.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho defecto óseo es una lesión osteolítica asociada a un cáncer.
- 6.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho defecto óseo es una fractura ósea.
- 30 **7.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho defecto óseo es una columna vertebral que necesita fusión.
- 8.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho defecto óseo es una fractura no consolidada.
- 9.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho defecto óseo es osteoporosis.
- 35 **10.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dichas células están formuladas como una composición implantable.
- 11.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha composición implantable comprende una matriz.
- 40 **12.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina, vitronectina o hidroxipatita.
- 13.** Las células adherentes placentarias osteogénicas aisladas para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dichas células están formuladas como una composición inyectable.

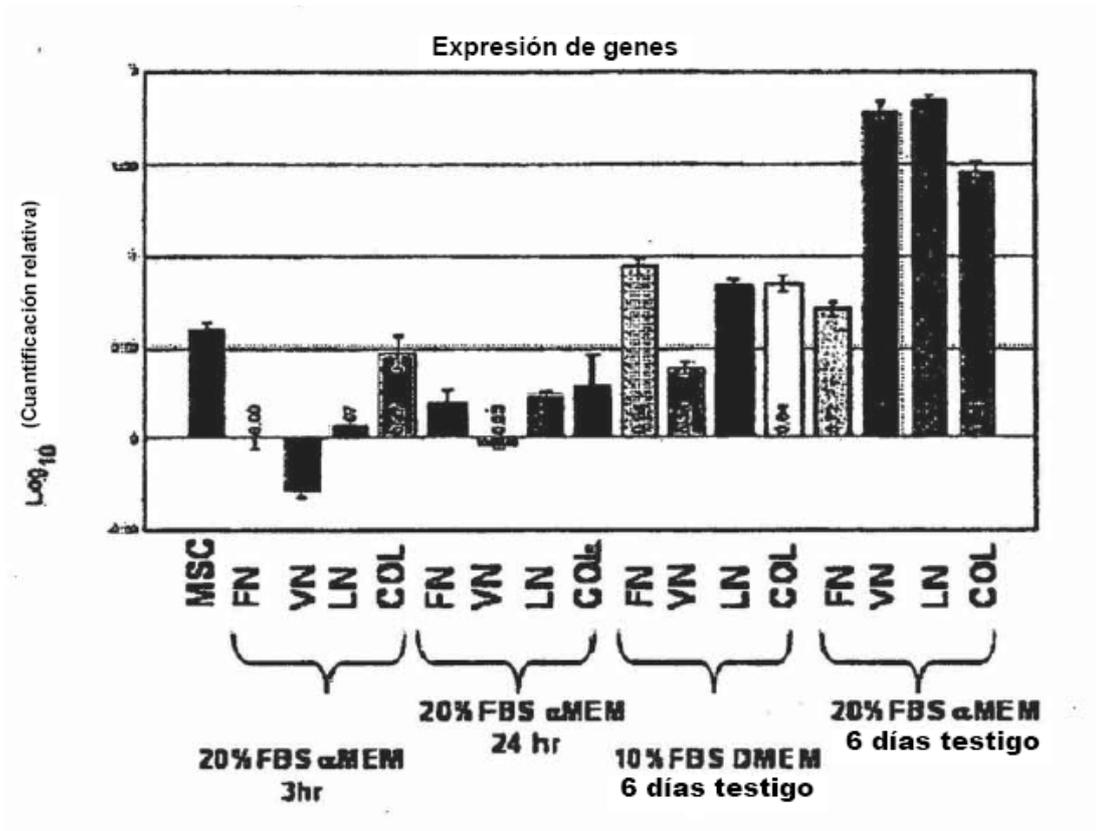


FIG.1

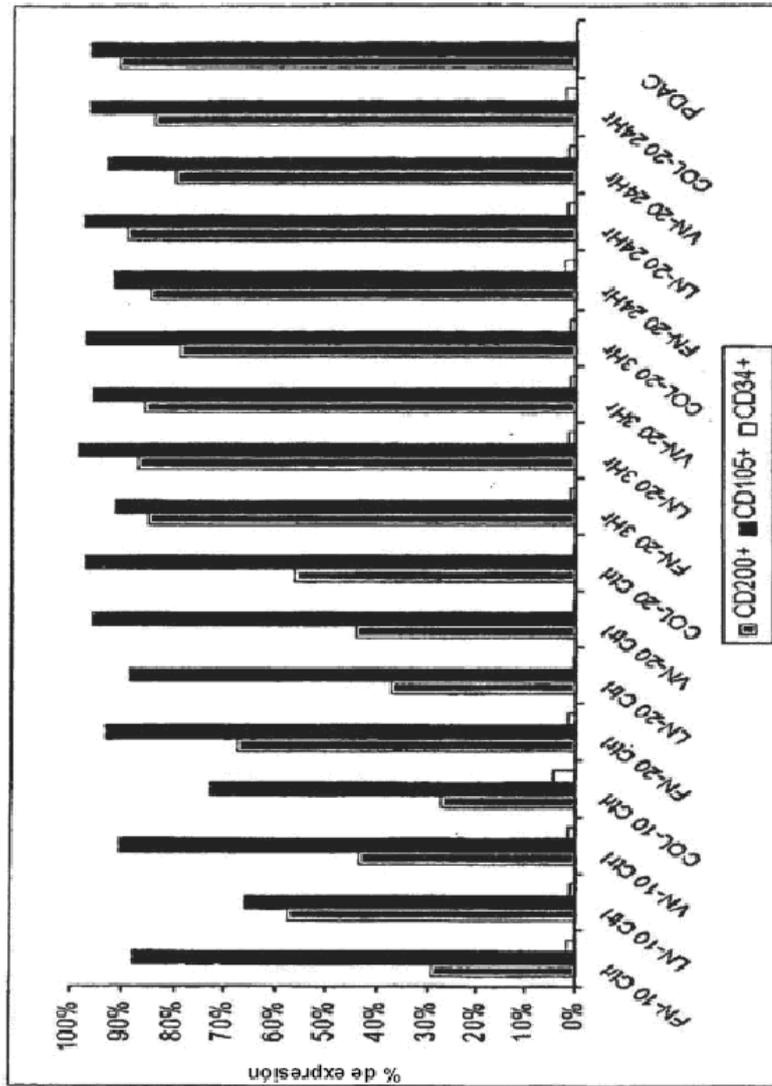


FIG. 2

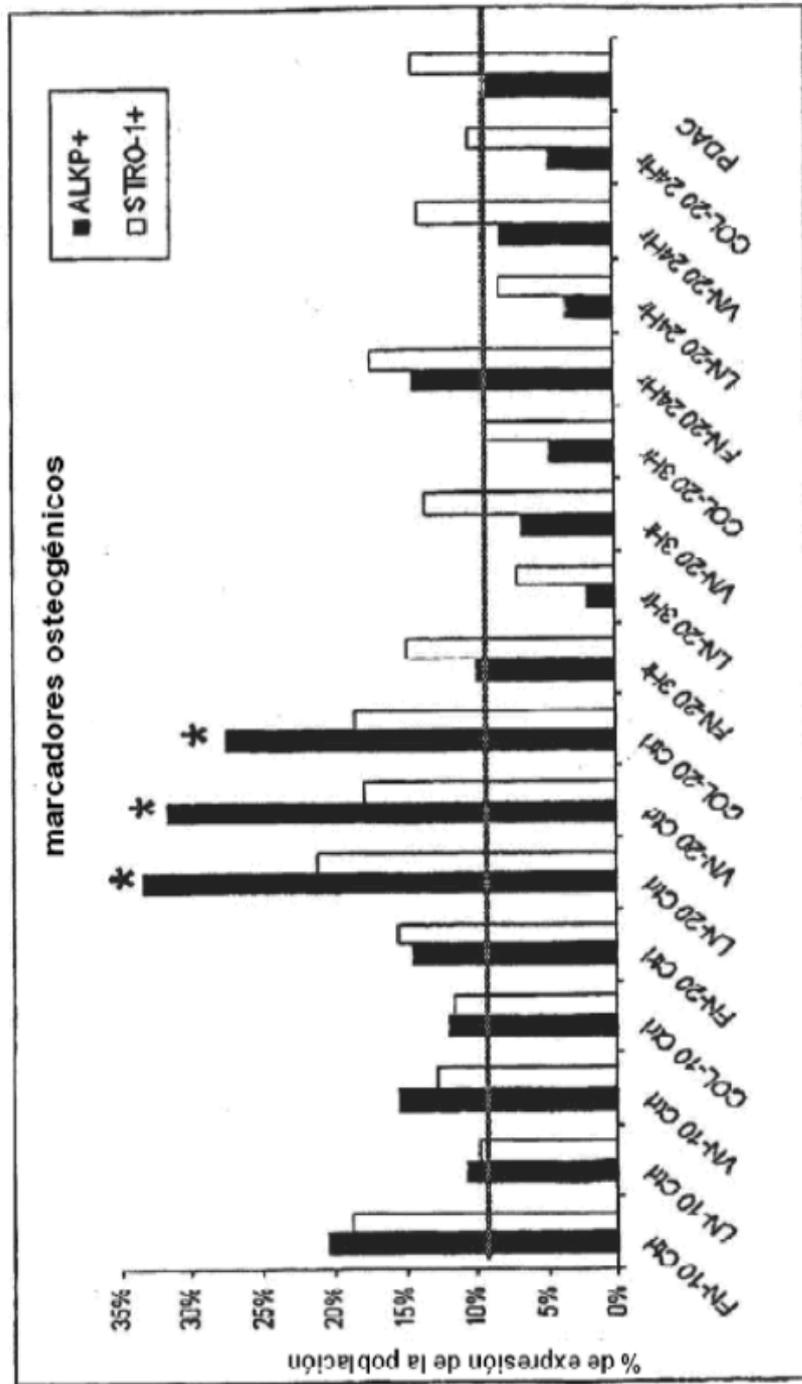


FIG. 3

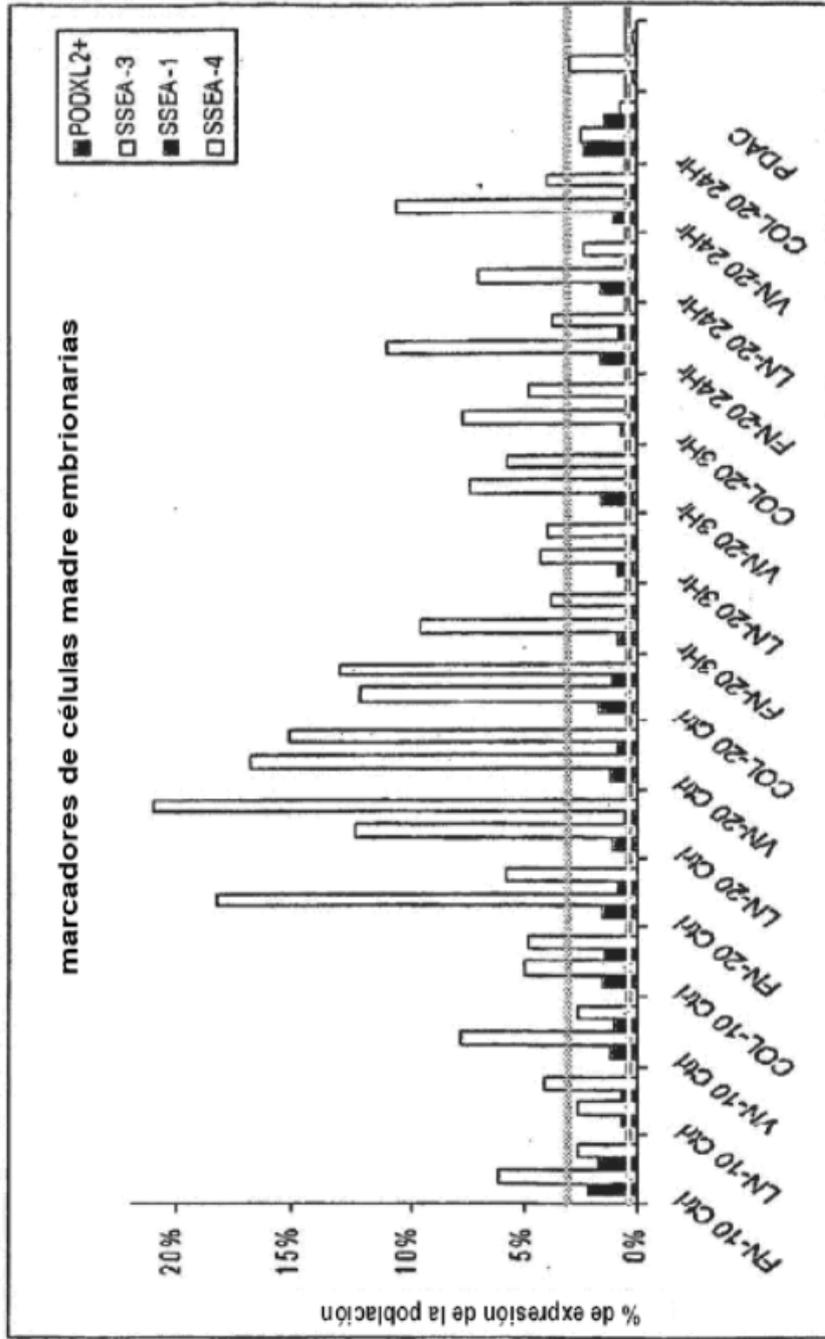


FIG. 4

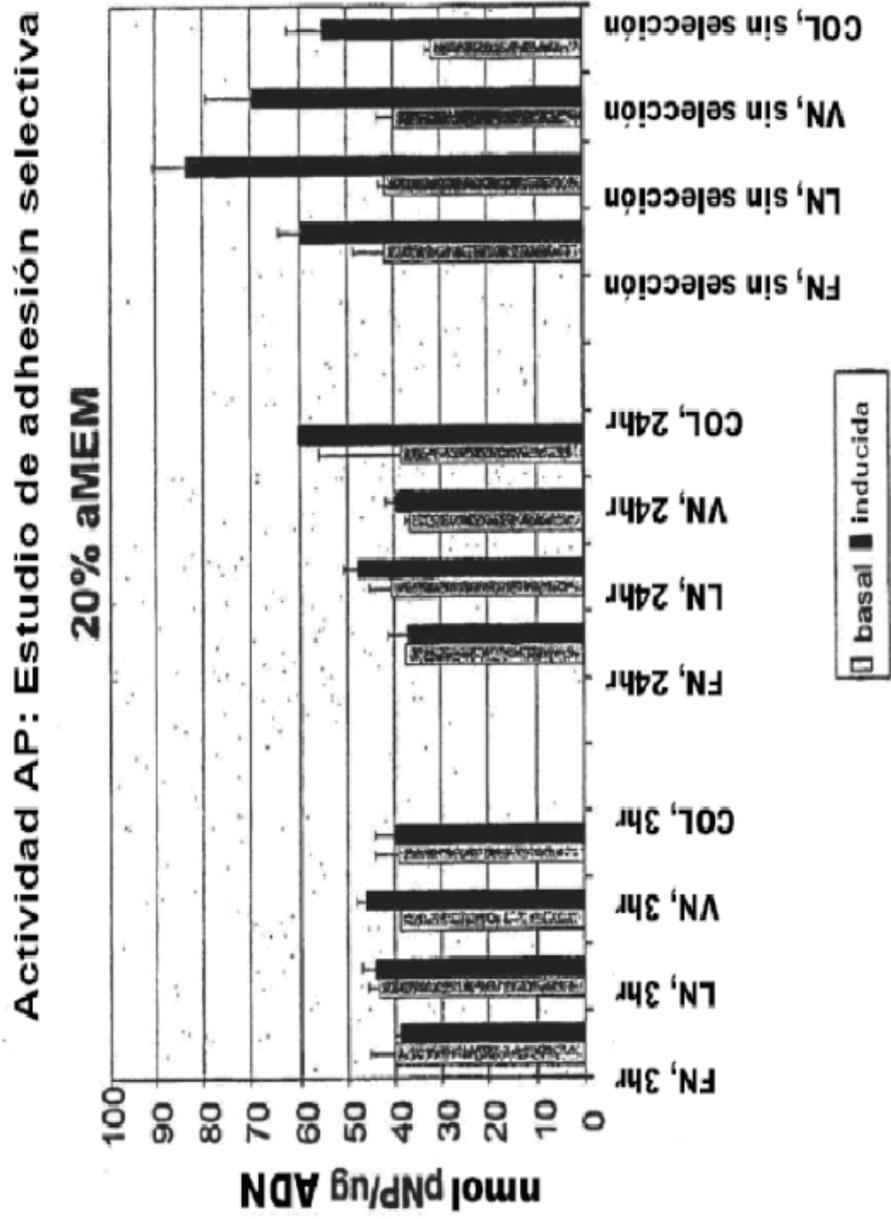


FIG. 5

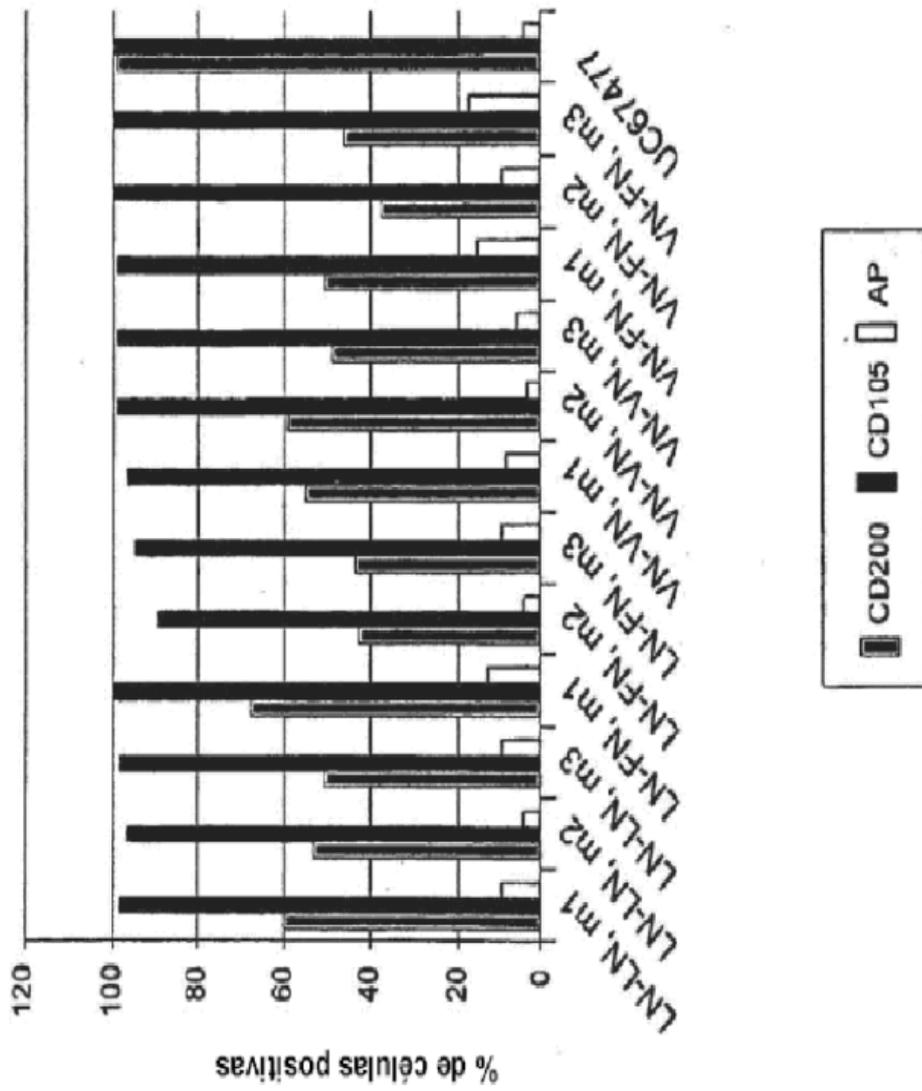


FIG. 6

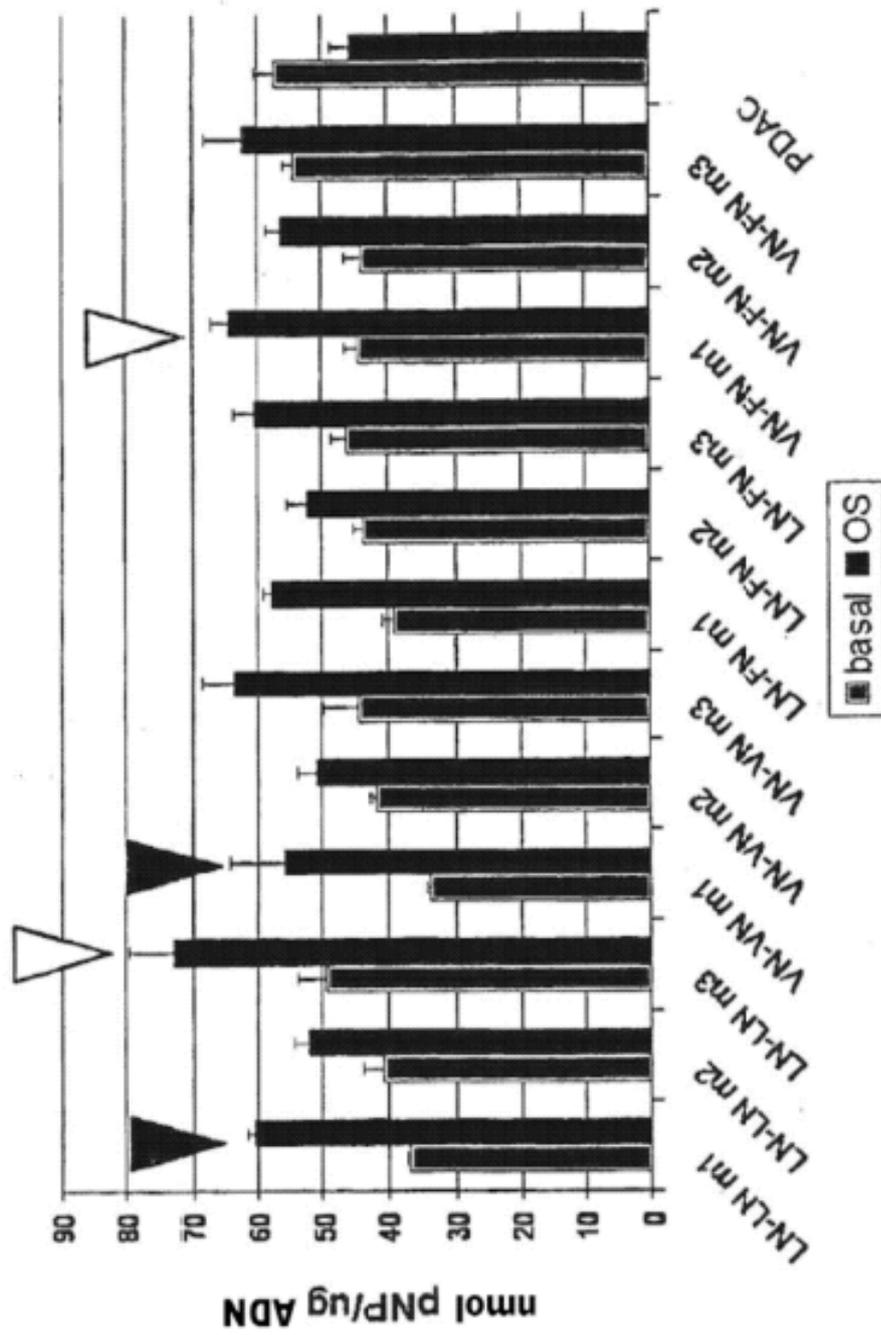


FIG. 7

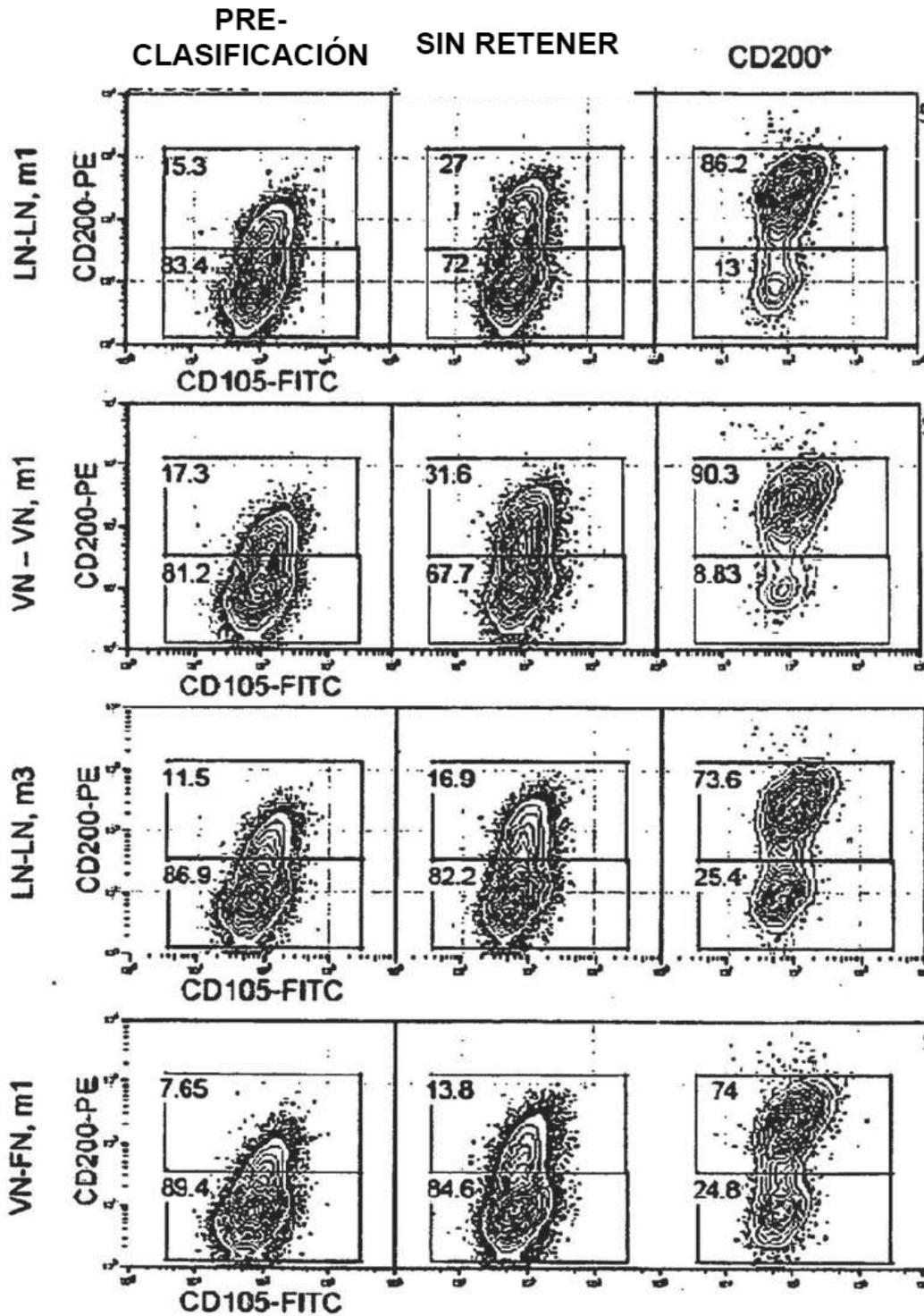


FIG. 8

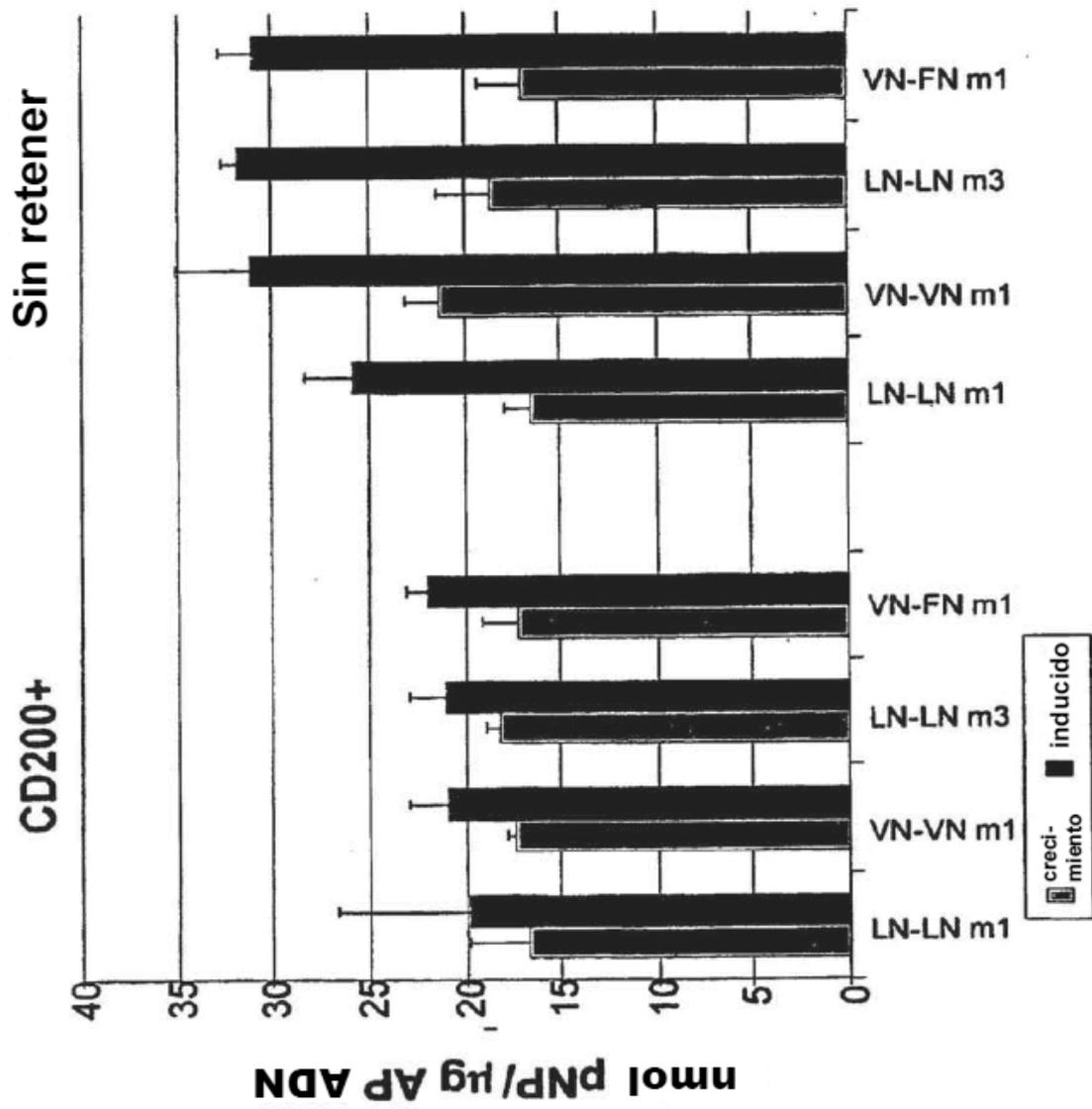


FIG. 9

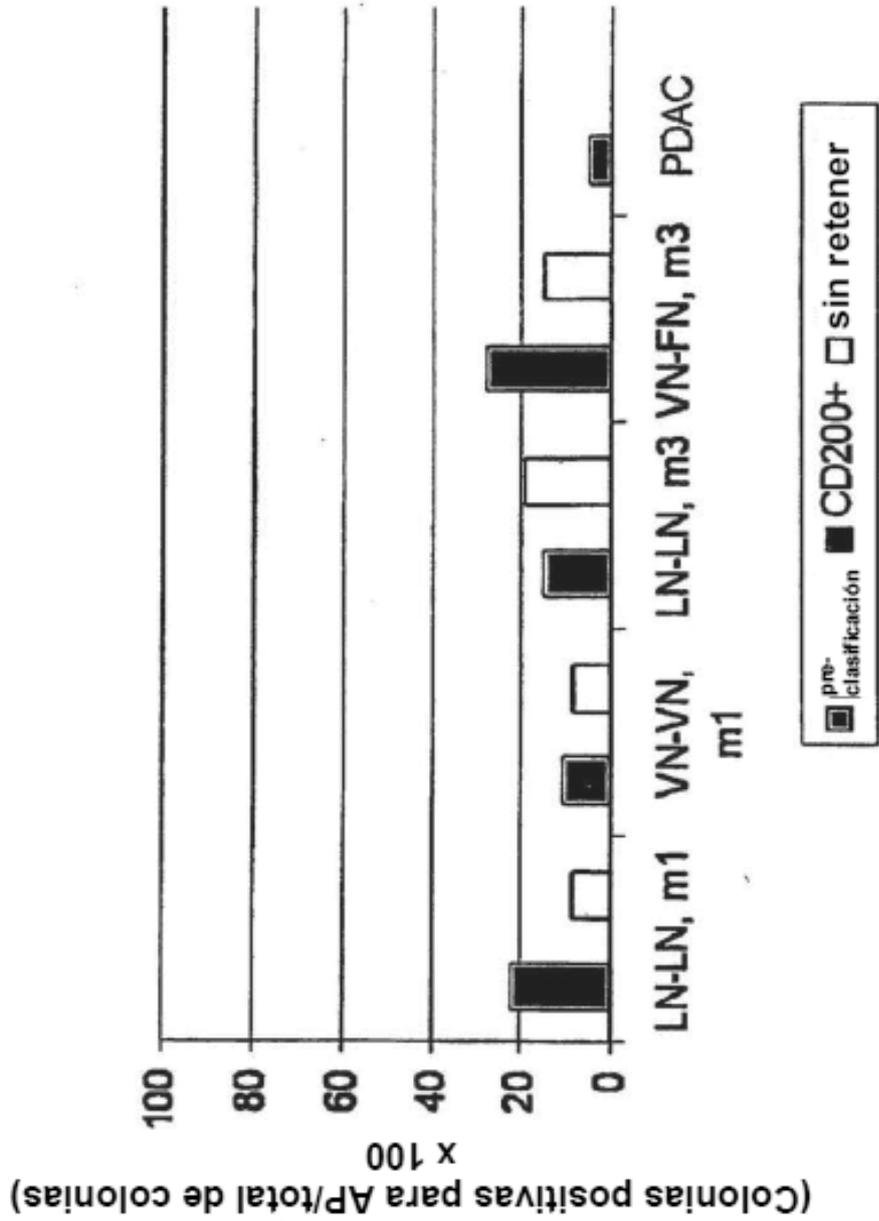


FIG. 10

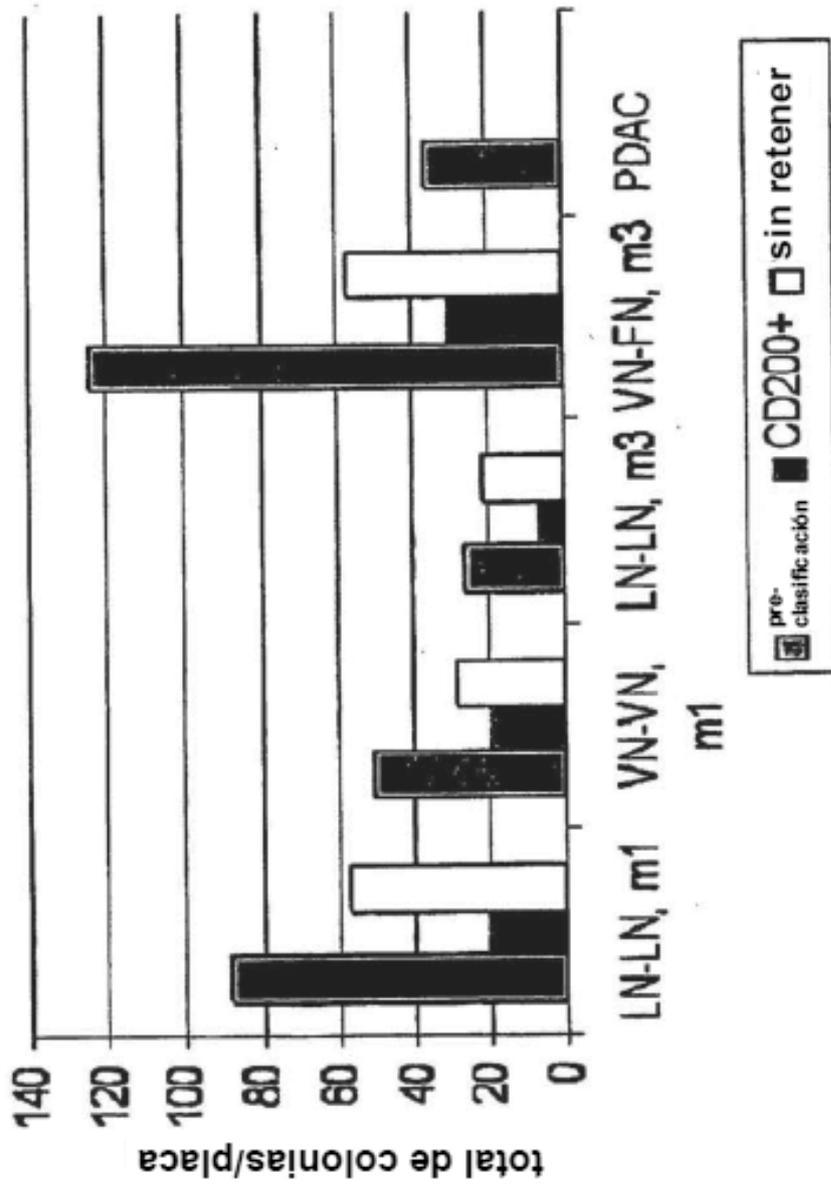


FIG. 11

Secreción comparativa de la osteoprotegerina por tipos de células en condiciones de crecimiento y osteogénicas

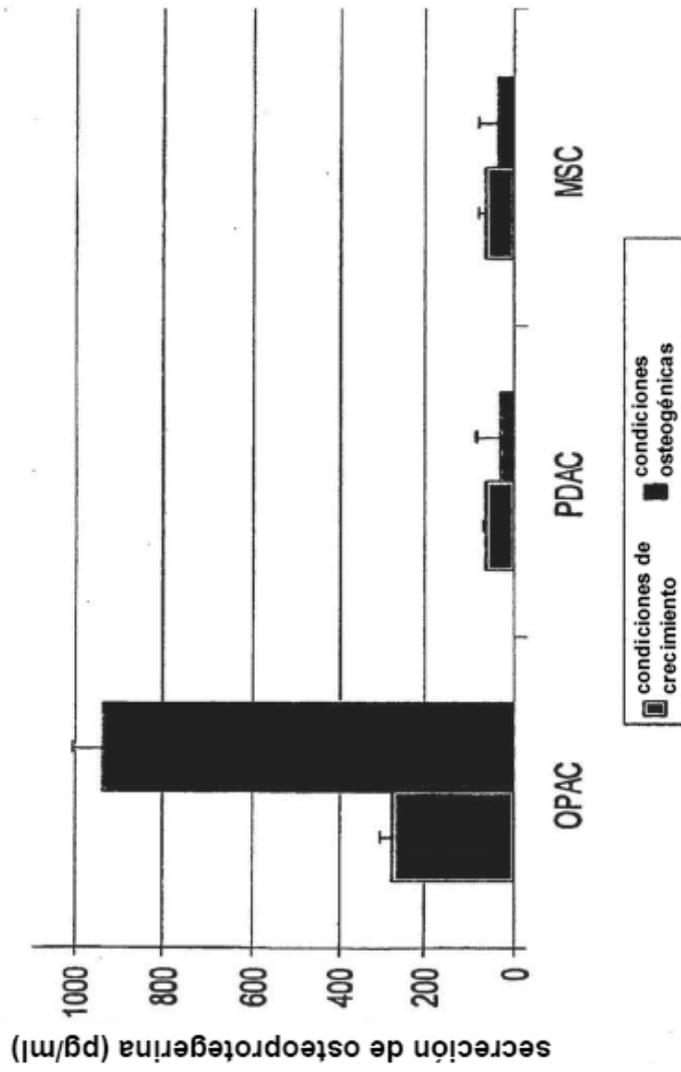


FIG. 12

Proteína	OPAC	PDACs	MSC	Fibroblastos	Formación de hueso	Proteína	OPAC	PDACs	MSC	Fibroblastos	Formación de hueso	Proteína	OPAC	PDACs	MSC	Fibroblastos	Formación de hueso
APRIL	+	+	+	+	↓	IGFBP-rp1 / IGFBP-7	+	+	+	+	↓	Prolactina	+	+	+	+	↓
CCR3	+	+	+	+	↓	IGF-II R	+	+	+	+	↓	SFRP-4	+	+	+	+	↓
Cerberus 1	+	+	+	+	↓	IL-2 R alfa	+	+	+	+	↓	Smad 4	+	+	+	+	↓
Csk	+	+	+	+	↓	IL-3 R alfa	+	+	+	+	↓	SPARC	+	+	+	+	↓
Factor de coagulación III/ Factor de tejido	+	+	+	+	↓	IL-5 R alfa	+	+	+	+	↓	Spinesin	+	+	+	+	↓
Decorina	+	+	+	+	↑	IL-9	+	+	+	+	↑	TFPI	+	+	+	+	↑
EDA-A2	+++	+++	+++	+++	↑	IL-12 R beta 2	+	+	+	+	↑	TGF-beta R1/ ALK-5	+	+	+	+	↑
Endostatina	+	+	+	+	↑	IL-17RC	+	+	+	+	↑	TGF-beta RIII	+	+	+	+	↑
Epirregulina	+	+	+	+	↑	IL-20 R beta	+	+	+	+	↑	Trombospondina (TSP)	+	+	+	+	↑
Endotelina	+	+	+	+	↑	IL-27	+	+	+	+	↑	Trombospondina-1	+	+	+	+	↑
FAM3B	+	+	+	+	↑	Proteína 1 de unión de TGF-beta latente	+	+	+	+	↑	TIMP-1	+	+	+	+	↑
FGF-7 / KGF	+	+	+	+	↑	LRP-1	+	+	+	+	↑	TIMP-2	+	+	+	+	↑
Folistatina tipo 1	+	+	+	+	↓	LRP-6	+++	+	+	+	↓	TMEFF1 / Tomorregulina-1	+	+	+	+	↓
Glipicano 3	+++	+	+	+	↓	NCAM-1 / CD56	+	+	+	+	↓	TSG-6	+	+	+	+	↓
IGFBP-3	+	+	+	+	↑	Osteoprotegerina/ TNFRSF11B	+	+	+	+	↑						
IGFBP-6	+	+	+	+	↓	Pentraxina3 / TSG-14	+	+	+	+	↓						

FIG. 13

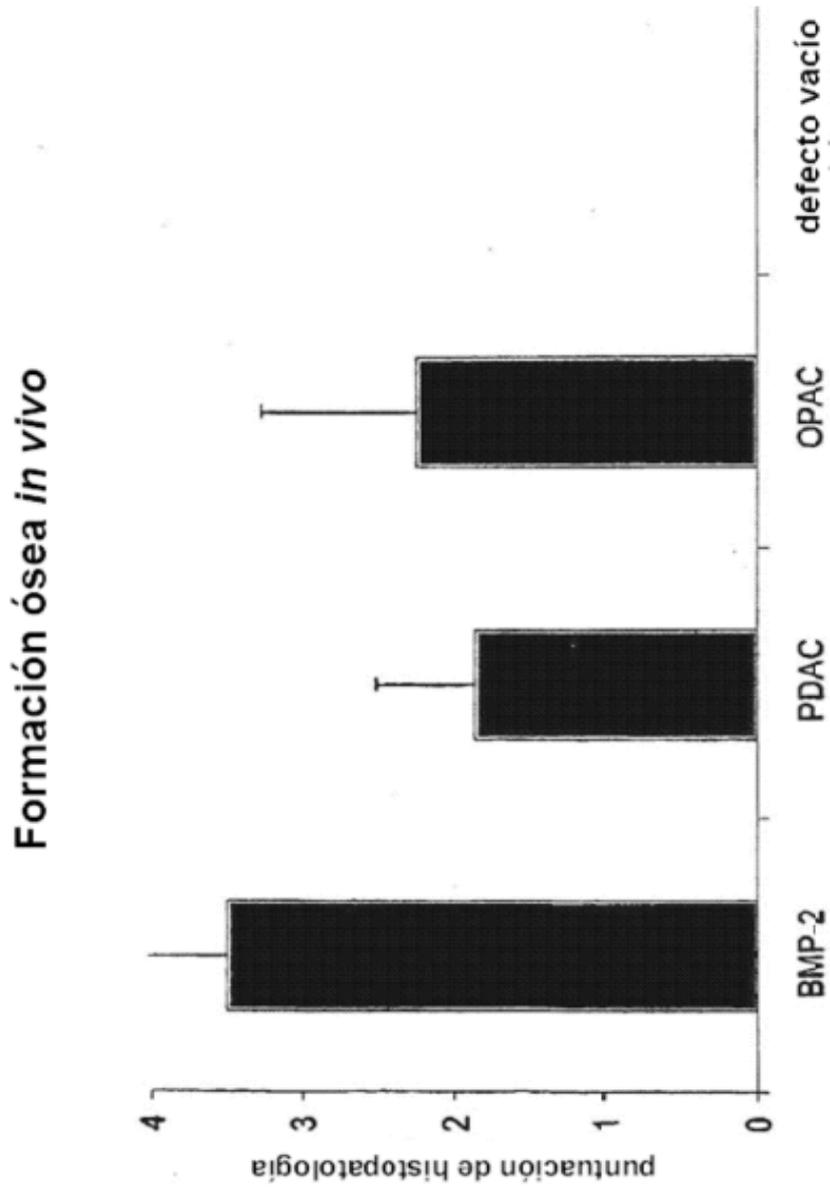


FIG. 14

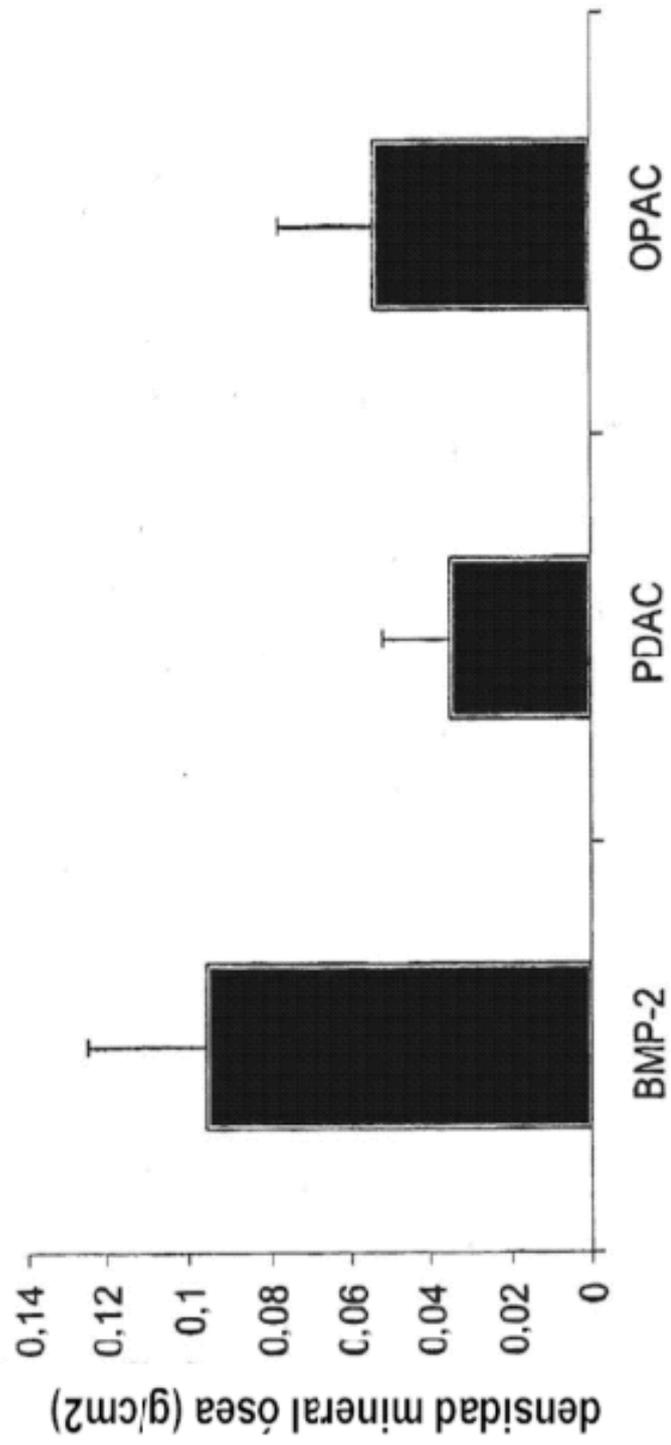


FIG. 15

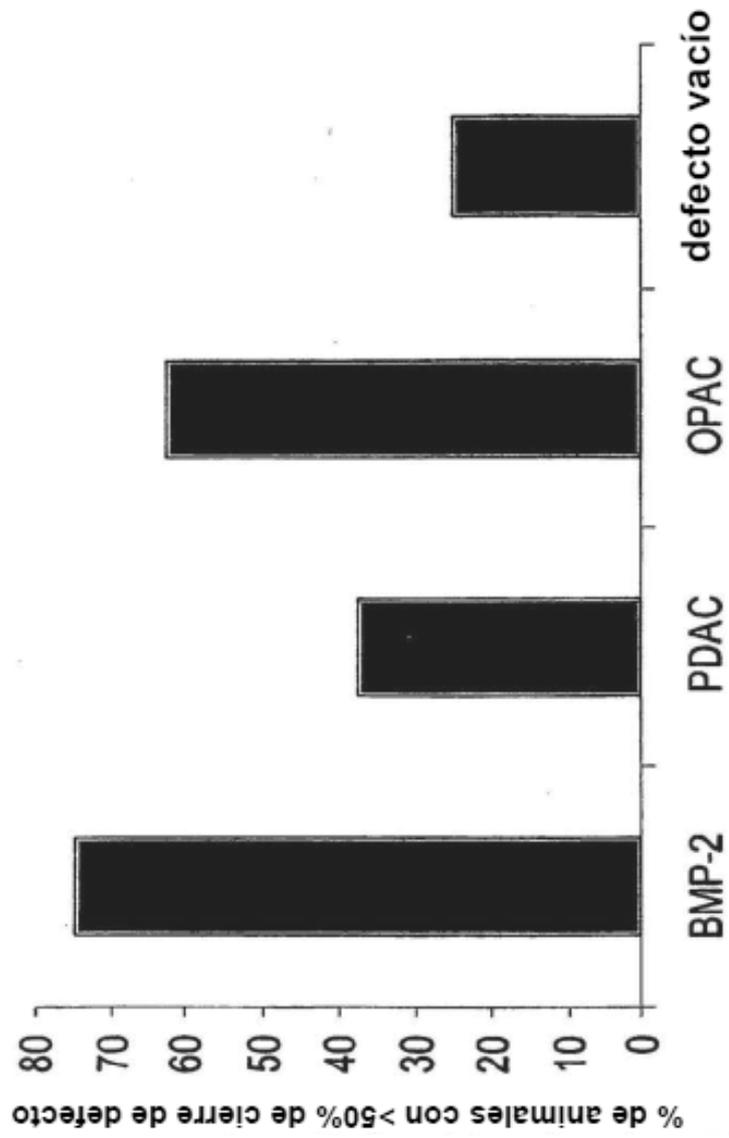


FIG. 16

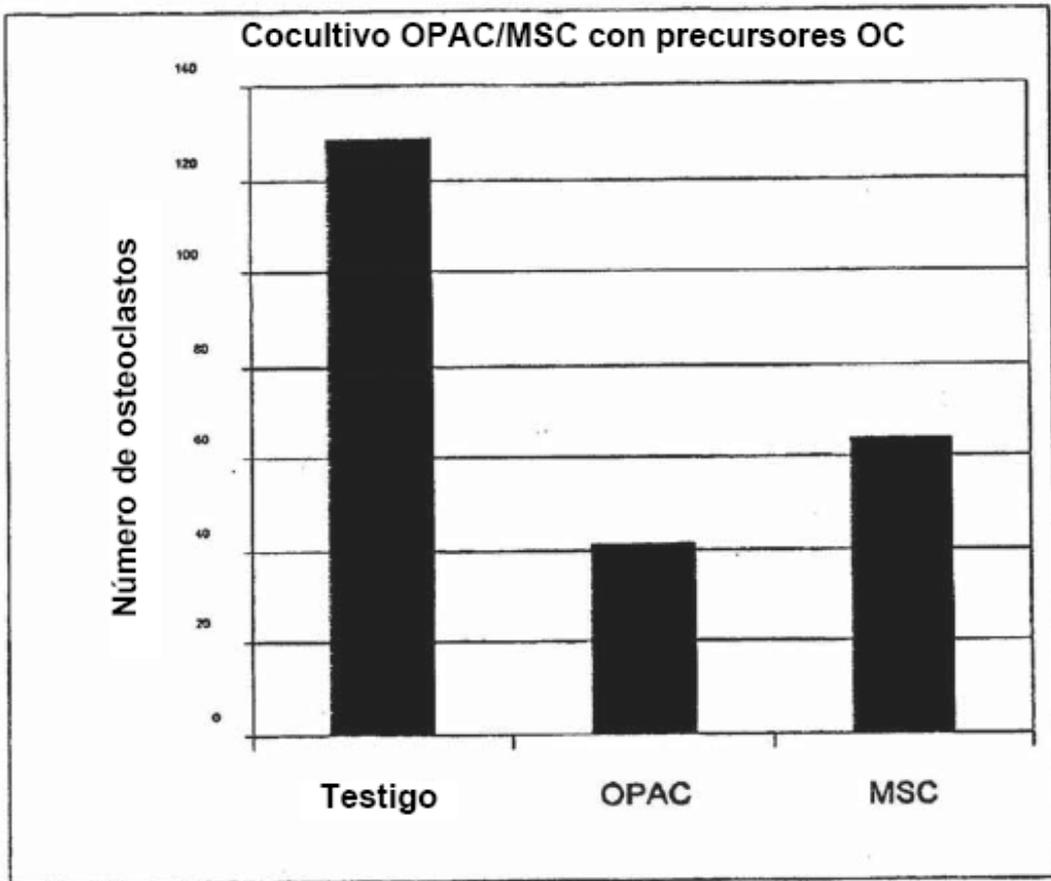


FIG. 17

Cocultivo de OB OPAC/MSO con células
Con MM de un paciente durante 72 hrs

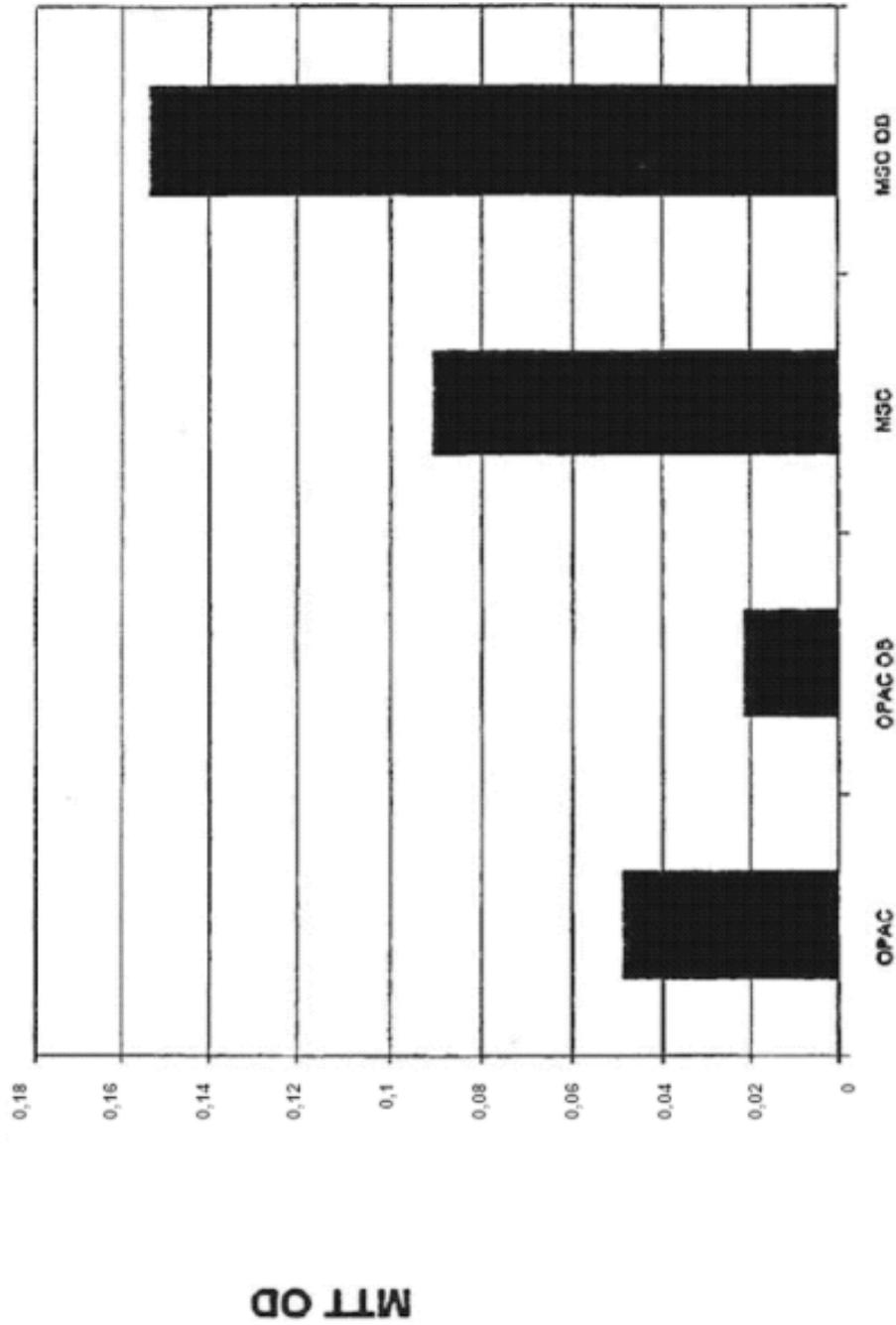


FIG. 18

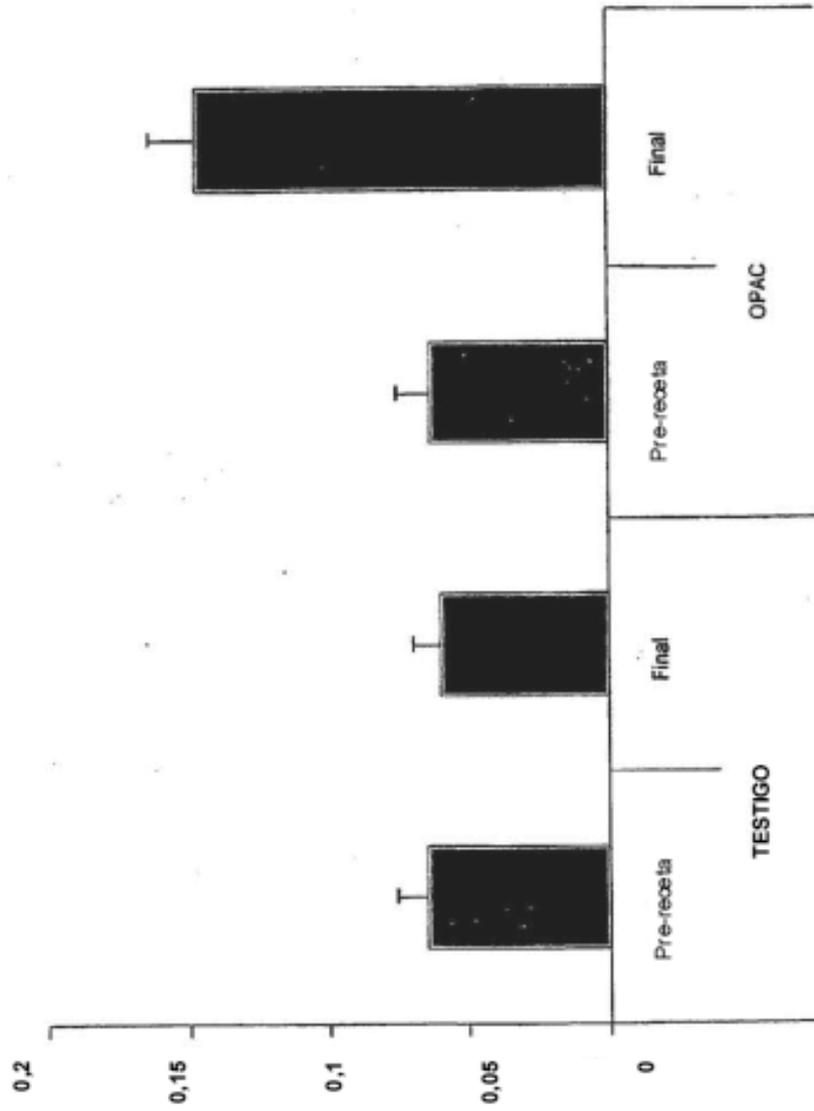


FIG. 19

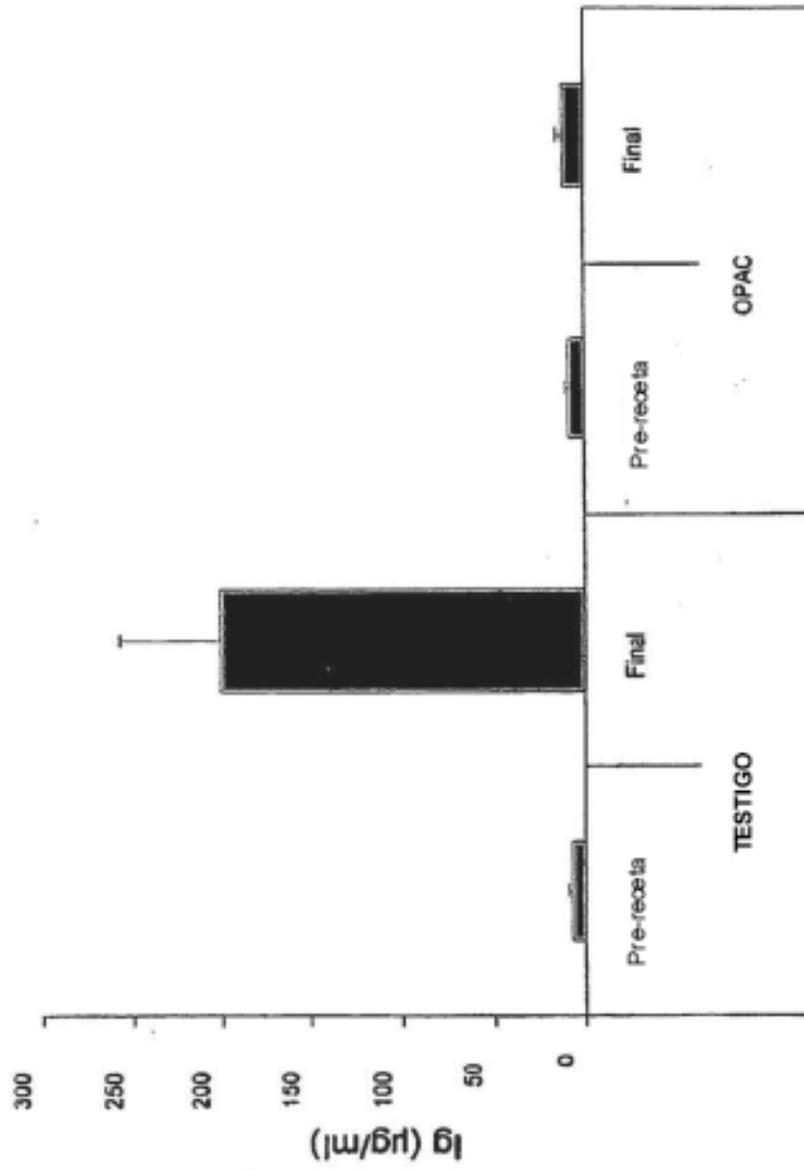


FIG. 20

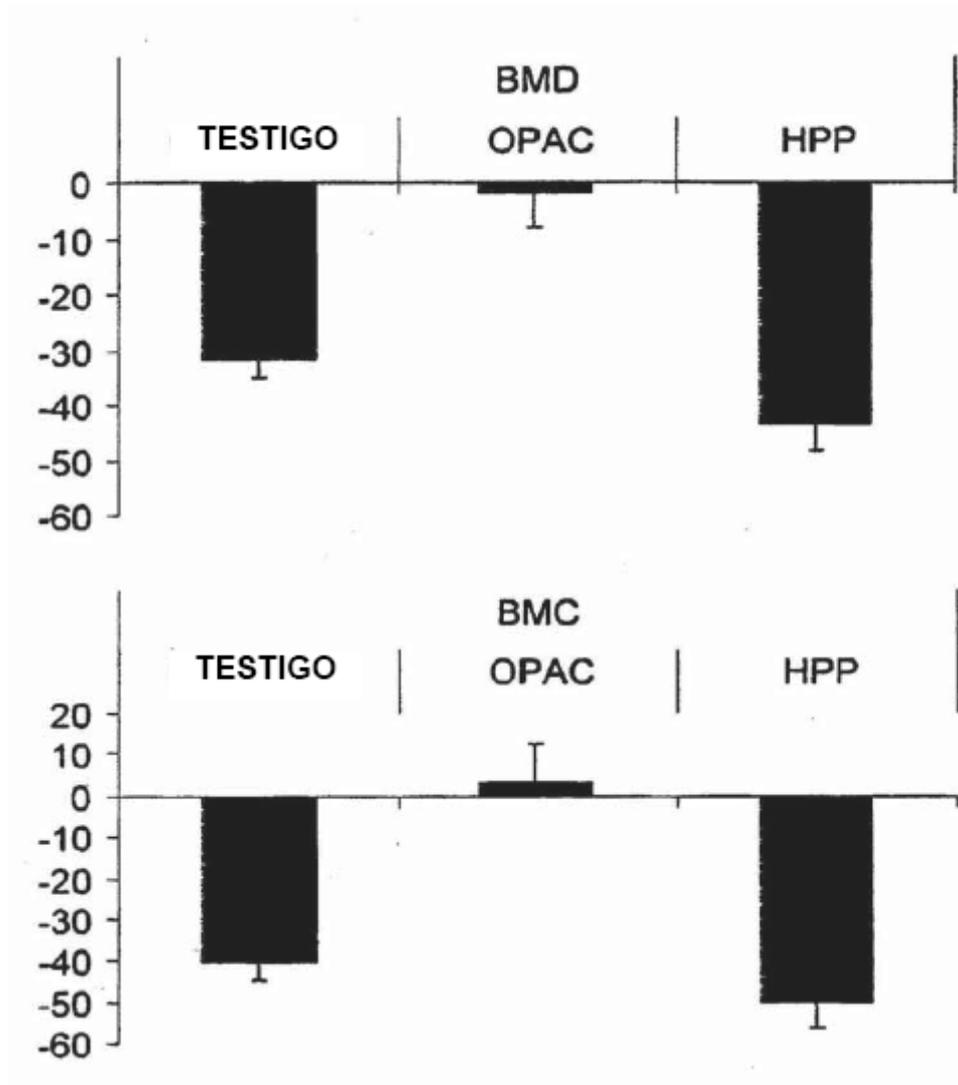


FIG. 21