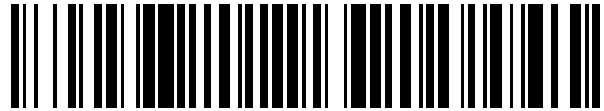


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 712**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

A61K 35/50 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2010 E 14170266 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2806023**

54 Título: **Células adherentes de la placenta y uso de las mismas en el tratamiento de enfermedad**

30 Prioridad:

30.11.2009 US 272985 P

06.08.2010 US 371459 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2015

73 Titular/es:

PLURISTEM LTD. (100.0%)

Matam Building 20

31905 Haifa, IL

72 Inventor/es:

ABERMAN, ZAMI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 553 712 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células adherentes de la placenta y uso de las mismas en el tratamiento de enfermedad

Campo y fundamentos de la invención

5 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células adherentes de la placenta para usar en el tratamiento de defectos del músculo esquelético.

10 En años recientes, una considerable actividad se ha enfocado en el potencial terapéutico de las células estromales mesenquimales (MSC) para diversas aplicaciones médicas que incluyen reparación tisular de órganos dañados tales como el cerebro, corazón, hueso e hígado y en el apoyo de trasplantes de médula ósea (BMT). MSC, una población heterogénea de células obtenidas de por ejemplo, médula ósea, tejido adiposo, placenta y sangre, son capaces de diferenciarse en diferentes tipos de células (por ejemplo, células de endotelio reticular, fibroblastos, adipocitos, células precursoras de osteogénesis) dependiendo de las influencias de diversos factores bioactivos. Por consiguiente, las MSC se han estudiado ampliamente en medicina regenerativa como la base para construir nuevos tejidos tales como hueso, cartílago y grasa para la reparación de lesión o sustitución de tejidos patológicos y como tratamiento para enfermedades genéticas y adquiridas [Fibbe y Noort, Ann N Y Acad Sci (2003) 996: 235-44; Horwitz et al., Cytotherapy (2005) 7(5): 393-5; Zimmet y Hare, Basic Res Cardiol (2005) 100(6): 471-81]. Además, la capacidad multipotente de las MSC, su fácil aislamiento y cultivo, además de su alto potencial de expansión *ex vivo* las hacen una herramienta terapéutica atractiva [Fibbe y Noort, supra; Minguell et al. Exp Biol Med (Maywood) (2001) 226(6): 507-20].

20 Un cuerpo emergente de datos indica que las MSC escapan al reconocimiento de células alorreactivas y se considera que están inmunoprivilegiadas [Le Blanc et al., Exp Hematol (2003) 31(10): 890-6]. Teniendo baja inmunogenicidad, las MSC no se rechazan por el sistema inmune del paciente y por lo tanto se considera que no necesitan apareamiento con HLA.

25 Las MSC derivadas de placenta muestran muchos marcadores comunes a las MSC aisladas de otros tejidos, por ejemplo CD105, CD73, CD90 y CD29, y la falta de expresión de marcadores celulares específicos hematopoyéticos, endoteliales y trofoblásticos. La diferenciación adipogénica, osteogénica y neurogénica se han alcanzado después de cultivar MSC derivadas de placenta bajo condiciones apropiadas [Yen et al., Stem Cells (2005) 23(1): 3-9]. Además, las MSC aisladas de placenta y cultivadas *in vitro* se ha demostrado que están inmunoprivilegiadas de un modo similar que las MSC [Li et al., Cell Res (2005) 15(7): 539-47]. Así, la placenta proporciona una fuente éticamente no controvertida y fácilmente accesible de MSC para las aplicaciones experimentales y clínicas [Zhang et al., Exp Hematol (2004) 32(7): 657-64]. Matziolis et al. (Tissue Engineering (2006) 12(2): 361-367) presentan que las células derivadas de médula ósea autóloga pueden mejorar la resistencia muscular después de lesión por rotura en ratas.

Compendio de la invención

35 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona poblaciones purificadas de células adherentes de la placenta que pueden usarse para tratar un defecto del músculo esquelético.

Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden una expresión de marcador positivo seleccionada del grupo que consiste en CD73, CD90, CD29, CD105 y D7-fib; esto es, en algunas realizaciones las células adherentes expresan uno o más de CD73, CD90, CD29, CD105 o D7-fib.

40 Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden una expresión de marcador negativo seleccionada del grupo que consiste en CD3, CD4, CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD31, CD200, KDR y CD79; esto es, en algunas realizaciones las células adherentes no expresan CD3, CD4, CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD31, CD200, KDR o CD79.

Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes se cultivan en un cultivo tridimensional (3D).

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

45 Según algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células adherentes en el cultivo 3D se efectúa bajo perfusión.

Según algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células adherentes se efectúa durante al menos 3 días.

50 Según algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células adherentes se efectúa hasta que al menos el 10% de las células adherentes están proliferando.

Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes se cultivan en un cultivo bidimensional (2D).

Según algunas realizaciones de la invención, al menos el 10% de las células adherentes están en un estado proliferativo; esto es, al menos el 10% de las células adherentes están proliferando.

Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes se destinan menos a una línea osteogénica en comparación con células adherentes de médula ósea que crecen y se dejan diferenciar en las mismas condiciones.

- 5 Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes se destinan menos a una línea adipogénica en comparación con células adherentes de médula ósea que crecen y se dejan diferenciar en las mismas condiciones.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una población de células adherentes derivadas de la placenta, en donde la población comprende al menos 70% de células adherentes de una parte materna de la placenta.

- 10 Según algunas realizaciones de la invención, la parte materna de la placenta comprende decidua basal, decidua parietal, o tanto decidua basal como decidua parietal.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una población de células adherentes derivadas de la placenta, en donde la población comprende al menos 70% de células adherentes de una parte fetal de la placenta.

- 15 Según algunas realizaciones de la invención, la parte fetal de la placenta comprende amnios.

Según algunas realizaciones de la invención, la parte fetal de la placenta consiste en amnios.

Según algunas realizaciones de la invención, la parte fetal de la placenta comprende vellosidad coriónica.

Según algunas realizaciones de la invención, la parte fetal de la placenta consiste en vellosidad coriónica.

- 20 Según algunas realizaciones de la invención, la población de células es una población en donde no más del 3,5%, no más del 3%, no más del 2%, o no más del 1% de la población de células adherentes de una parte materna expresan CD200 como se mide por citometría de flujo usando un control de isotipo para definir la expresión negativa.

Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden un diámetro celular que es menor que el de las células adherentes derivadas de una parte fetal de la placenta.

- 25 Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden una capacidad de proliferación celular que es mayor que el de las células adherentes derivadas de una parte fetal de la placenta.

Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes son capaces de suprimir una reacción inmune a una menor extensión que las células adherentes de una parte fetal de la placenta cuando se ensayan en un cultivo de linfocitos mixto.

- 30 También se describe un medio acondicionado aislado de un cultivo que comprende cualquiera de las poblaciones de células anteriores.

También se describe una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo cualquiera de la población de células descritas en esta memoria o cualquiera de los medios acondicionados descritos en esta memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 35 También se describe un método para tratar un proceso médico que puede aprovechar el trasplante de célula u órgano que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria, tratando así al sujeto.

- 40 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona el uso de cualquiera de la población de células descritas en esta memoria, para la fabricación de un medicamento para tratar un defecto de músculo esquelético.

- 45 Se describen además usos para tratar un proceso seleccionado del grupo que consiste en isquemia, enfermedad arterial periférica (PAD), isquemia crítica de la pata (CLI), isquemia de la extremidad inferior, ictus, enfermedad vascular isquémica, enfermedad vascular del riñón, enfermedad coronaria isquémica, isquemia de miocardio, enfermedad arterial coronaria (CAD), enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad de arteria coronaria principal izquierda, enfermedad oclusiva arterial, isquemia periférica, enfermedad vascular periférica, arteriosclerosis, retinopatía, reparación de retina, trastorno de remodelación, síndrome de von Hippel-Lindau, enfermedad vascular telangiectasiaisquémica hemorrágica hereditaria, enfermedad de Buerger, enfermedad renal isquémica, placenta isquémica, trastornos asociados con la reproducción, enfermedad de huésped frente a injerto, trasplante de órgano sólido, trasplante de células madre hematopoyéticas, diabetes, daño en tejido conectivo,
50 cáncer, pre-cáncer, cáncer de hueso, osteosarcoma, metástasis ósea, fractura ósea, herida por quemado, defecto de cartílago articular, herida profunda, curado de herida retrasado, curado de úlcera retrasado, quiste óseo

subcondral, osteoporosis, osteoartritis, hueso degenerado, daño en cartílago, defecto de cartílago articular, tendones lesionados, enfermedades autoinmunes, trastornos metabólicos, psoriasis, dolor neuropático, lesión del nervio periférico, enfermedad neurodegenerativa, soporte de trasplante de riñón y enfermedades inflamatorias.

5 También se describen usos para tratar un proceso seleccionado del grupo que consiste en fallo cardiaco, infarto de miocardio, dolor neuropático, ictus y enfermedad cardiaca isquémica.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, el uso es para el tratamiento de un defecto de músculo esquelético que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición que comprende células estromales adherentes derivadas de la placenta, tratando así el defecto del músculo esquelético.

10 Además se describe un método para tratar el dolor neuropático que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición que comprende células estromales adherentes derivadas de placenta, tratando así el dolor neuropático.

Algunas veces, el dolor neuropático se asocia con dolor inflamatorio, polineuropatía diabética, neuropatía sensorial por virus de inmunodeficiencia humano (VIH), síndromes post-ictus, isquemia o esclerosis múltiple.

15 Además se describe un método para tratar infarto de miocardio que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición que comprende células estromales adherentes derivadas de placenta, tratando así el infarto de miocardio.

20 Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención se proporciona un uso de una composición que comprende células estromales adherentes derivadas de placenta para la fabricación de un medicamento para tratar un defecto del músculo esquelético, dolor neuropático, infarto de miocardio.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo células estromales adherentes derivadas de placenta para usar en el tratamiento de defecto del músculo esquelético.

25 También se describe una composición farmacéutica para tratar el dolor neuropático que se asocia con dolor inflamatorio, polineuropatía diabética, neuropatía sensorial por virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), síndromes post-ictus, isquemia o esclerosis múltiple.

Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes expresan uno o más de CD73, CD90, CD29, CD 105 o D7-fib.

30 Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes no expresan CD3, CD4, CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD31, CD200, CD271, KDR o CD79.

Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes expresan uno o más de beta-endorfina, dinorfina A, leu-encefalina o met-encefalina.

Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes suprimen la actividad de las células T.

35 Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden al menos 70% de células adherentes procedentes de una parte materna de la placenta.

Según algunas realizaciones de la invención, no más del 3,5%, no más del 3%, no más del 2% o no más del 1% de las células adherentes de una parte materna expresan CD200 como se mide por citometría de flujo usando un control de isotipo para definir la expresión negativa.

40 Según algunas realizaciones de la invención, la parte materna de la placenta comprende decidua basal, decidua parietal, o tanto decidua basal como decidua parietal.

Según algunas realizaciones de la invención, las células adherentes se producen mediante cultivo usando condiciones de cultivo 3D.

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

Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, el cultivo 3D se efectúa bajo perfusión.

45 Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células adherentes se efectúa durante al menos 3 días.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células adherente se efectúa hasta que al menos el 10% de dichas células adherentes están proliferando.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y/o científicos usados en esta memoria tienen el mismo significado que se entiende normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, en la práctica o ensayo de realizaciones de la invención, se describen a continuación métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, la memoria de patente, incluyendo definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en esta memoria, por medio solo de ejemplo, con referencia a los dibujos de acompañamiento. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se subraya que los particulares se muestran en forma de ejemplo y con propósitos de exposición ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la técnica como pueden ponerse en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

La Figura 1 es una ilustración esquemática de la estructura y partes de la placenta.

La Figura 2A-C son fotomicrografos que muestran la morfología de células adherentes derivadas de placenta decidua basal (A), estroma vellosa (B) y membrana amniótica (C).

La Figura 3 es un gráfico que muestra el diámetro de la célula frente al número de pasos de células de diferentes partes de placenta.

La Figura 4 es un gráfico que muestra el doblaje de población frente al número de pasos de células de diferentes partes de placenta.

Las Figuras 5A-B son histogramas que muestran las propiedades de inmunomodulación in vitro de las diversas partes de placenta. La Figura 5A muestra los resultados de cuatro experimentos diferentes mientras la Figura 5B muestra el promedio de resultados obtenidos en la Figura 5A que incluye desviación estándar.

Las Figuras 6A-C son gráficos de barras que muestran el efecto de medio acondicionado de células adherentes de varias partes de placenta en proliferación celular endotelial.

La Figura 7 muestra los valores de fuerza de contracción en ratas tratadas PLX ("PLX") y de control ("Sham"). "I" - trasplante inmediato después del trauma; "DEL" - trasplante 7 días después de trauma; "FT" - fuerza de contracción de sacudida rápida; "TET" - fuerza de contracción titánica.

Las Figuras 8A y 8B muestran los efectos de células PLX en dolor inflamatorio en el ensayo de presión de pata. La Figura 8A representa el umbral de presión de pata como una función de tiempo en la pata inflamada. La Figura 8B muestra la misma información para la pata contralateral.

Las Figuras 9A y 9B muestran el volumen de pata representado como una función de tiempo después de la administración de células PLX en la pata inflamada (Fig. 9A) y la pata contralateral (Fig. 9B).

Las Figuras 10A y 4B ilustran los efectos de células PLX en sensibilidad mecánica (ensayo de von Frey) en dolor neuropático en la pata ipsilateral (Fig. 10A) y la pata contralateral (Fig. 10B).

Las Figuras 11A y 5B representan los efectos de células PLX en sensibilidad térmica (ensayo de Hargreaves) en dolor neuropático en la pata ipsilateral (Fig. 11A) y la pata contralateral (Fig. 11B).

Las Figuras 12A-E representan niveles de beta-endorfina (Fig. 12A), dinorfina A (Fig. 12B), leu-encefalina (Fig. 12C), met-encefalina (Fig. 12D), y total (Fig. 12E) en 9 cargas de PLX diferentes.

Descripción de realizaciones de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células adherentes de la placenta para usar en el tratamiento de defectos del músculo esquelético.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, se va a entender que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles presentados en la siguiente descripción o ejemplificada por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ponerse en práctica o llevarse a cabo de varias formas.

La placenta representa una fuente fácilmente disponible de células dotadas con propiedades únicas inmunosupresoras o de regeneración tisular. Las poblaciones purificadas de células adherentes de la placenta o acondicionadas a partir de esas células son valiosas en el tratamiento de procesos que pueden beneficiarse del trasplante de célula u órgano.

- Además, el actual inventor ha ideado un método para aislar poblaciones celulares altamente purificadas desde diferentes partes de placenta (véase la sección Ejemplos posterior). Sorprendentemente se descubrió que las poblaciones celulares aisladas de partes maternas de la placenta se caracterizan por propiedades morfológicas y funcionales únicas que son distintos de otras poblaciones celulares aisladas de fracciones de placenta fetal (véase sección de Ejemplos que sigue). Estas células son valiosas para el tratamiento de una miríada de procesos médicos.
- 5 Así, según un aspecto de la presente invención se proporciona una población de células adherentes que comprenden al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 98%, 99% o incluso 100% de células de una parte materna de placenta.
- 10 Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una población de células que comprenden al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 98%, 99% o incluso 100% de células adherentes de una parte fetal de placenta.
- Según realizaciones específicas, la parte fetal de la placenta comprende amnios.
- Según realizaciones específicas, la parte fetal de la placenta consiste en amnios.
- Según realizaciones específicas, la parte fetal de la placenta comprende vellosidades coriónicas.
- 15 Según realizaciones específicas, la parte fetal de la placenta consiste en vellosidades coriónicas.
- Como se usa en esta memoria el término "placenta" se refiere al órgano mamífero que conecta el feto en desarrollo a la pared uterina. Después del nacimiento, la placenta se expulsa (y se denomina como una placenta post-parto).
- La placenta se perfunde preferiblemente durante un periodo de tiempo suficiente para eliminar células residuales (por ejemplo, sangre).
- 20 Como se usa en esta memoria "parte fetal de la placenta" se refiere a cualquier parte de la placenta que no es materna (véase la Figura 1 para ilustración estructural).
- Como se usa en esta memoria "parte materna de la placenta" se refiere a cualquier parte de la placenta que no es fetal (véase la Figura 1 para ilustración estructural), por ejemplo, esas partes de la placenta que se derivan de la decidua basal o decidua parietal.
- 25 Las partes fetales de placenta incluyen el amnios, corión o vellosidades coriónicas, véase la Figura 1.
- Los métodos de disección de la placenta para obtener células se conocen bien en la técnica. Algunos se describen en detalle en la sección de Ejemplos que sigue.
- Las muestras de tejido se lavan en un tampón fisiológico [por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón de Hank]. Las suspensiones de célula sencilla se hacen tratando el tejido con una enzima digestiva (véase a continuación) y/o picando y enjuagando las partes de tejido a través de un filtro de nailon o por pipeteado suave (Falcon, Becton, Dickinson, San José, CA) con medio de lavado.
- 30 Las células adherentes aisladas de las diversas partes de placenta pueden derivarse tratando el tejido con una enzima digestiva tal como colagenasa, tripsina y/o dispasa; y/o concentraciones efectivas de hialuronidasa o ADNasa; y ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA); a temperatura entre 25 - 50°C, durante periodos de entre 10 minutos a 3 horas. Las células pueden pasarse entonces a través de un filtro de malla de nailon o estopilla de entre 20 micras a 1 mm. Las células se centrifugan a velocidades de entre 100 a 3000 x g durante periodos de entre 1 minuto a 1 hora a temperaturas de entre 4- 50°C (véase la Pat. de EE.UU. núm. 7.078.230).
- 35 La recuperación celular se efectúa preferiblemente bajo condiciones asépticas. Una vez que se obtienen células aisladas, se dejan adherir a un material adherente (por ejemplo, configurado como una superficie) y así aislar células adherentes.
- 40 Como se usa en esta memoria la frase "células adherentes" se refieren a células que son dependientes del anclaje, es decir, necesitan unión a una superficie para crecer *in vitro*.
- Como se usa en esta memoria "un material adherente" se refiere a un material no citotóxico (es decir, biológicamente compatible) sintético, que se da de forma natural o una combinación de los mismos, que tiene una estructura química (por ejemplo, grupos expuestos de superficie cargada) que puede retener las células en una superficie.
- 45 Ejemplos de materiales adherentes que pueden usarse de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen, aunque no están limitados a, un poliéster, un polipropileno, un polialquileno, un polifluorocloroetileno, un poli(cloruro de vinilo), un poliestireno, una polisulfona, un acetato de celulosa, una fibra de vidrio, una partícula cerámica, un matrigel, un componente de matriz extracelular (por ejemplo, fibronectina, vitronectina, condronectina, laminina), un colágeno, un poli(ácido L láctico), un dextrano y una fibra metálica inerte.
- 50

Etapas adicionales de purificación o enriquecimiento para células adherentes pueden efectuarse usando métodos que se conocen bien en la técnica (tal como mediante FACS usando expresión de marcador, como se describe adicionalmente en esta memoria a continuación).

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

20 El medio puede suplementarse tal como con suero tal como suero fetal bovino o humano u otras especies, y opcionalmente o alternativamente, factores de crecimiento, vitaminas (por ejemplo, ácido ascórbico), citoquinas, sales (por ejemplo, B-glicerofosfato), esteroides (por ejemplo, dexametasona) y hormonas, por ejemplo, hormona de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, interleuquina 3, interleuquina 6, interleuquina 7, factor estimulante de la colonia de macrófagos, factor de ligando c-kit/célula madre, ligando de osteoprotegerina, insulina, factores de crecimiento tipo insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de nervio, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas y proteína morfogenética ósea a concentraciones de entre niveles de picogramo/ml a miligramo/ml.

Se reconoce adicionalmente que pueden añadirse componentes adicionales al medio de cultivo. Dichos componentes pueden ser antibióticos, antimicóticos, albúmina, aminoácidos y otros componentes conocidos en la técnica del cultivo de células.

30 La calificación adicional de las poblaciones celulares, es decir, células de placenta materna o fetal, puede efectuarse en cada etapa del proceso de purificación. Por ejemplo, la placenta de embrión macho puede calificarse para células fetales o maternas basadas en análisis de cariotipo (es decir, las células XX son maternas mientras las células XY son fetales, véase la sección de Ejemplos que sigue).

35 Una vez obtenidas, las células adherentes de la placenta pueden usarse como están o propagarse en el cultivo. Las células pueden pasarse a condiciones 2D o 3D. Se apreciará sin embargo, que las células pueden transferirse a una matriz configurada en 3D inmediatamente después del aislamiento o de forma alternativa, pueden pasarse a disposiciones 3D después de condiciones 2D.

40 Como se usa en esta memoria la frase "cultivo bidimensional" se refiere a un cultivo en que las células están predispuestas a condiciones que son compatibles con el crecimiento celular mientras se permite que las células crezcan en un plano. Las condiciones en el cultivo bidimensional de la invención se diseñan para permitir la expansión de las células adherentes.

45 Como se usa en esta memoria la frase "cultivo tridimensional" se refiere a un cultivo en que las células están predispuestas a condiciones que son compatibles con el crecimiento celular que incluye un armazón que permite los contactos célula a célula en tres dimensiones. Se apreciará bien que el medio *in situ* de una célula en un organismo vivo (o un tejido) está en una arquitectura tridimensional. Las células están rodeadas por otras células. Están contenidas en una red compleja de fibras en nanoescala de matriz extracelular que permite el establecimiento de diversos microambientes locales. Sus ligandos extracelulares median no solo la unión a la membrana basal sino también el acceso a una variedad de vasos vasculares y linfáticos. Oxígeno, hormonas y nutrientes se transportan a las células y los productos de desecho se eliminan. Las condiciones en el cultivo tridimensional de la invención se diseñan para emular dicho medio como se ejemplifica adicionalmente a continuación.

50 Se apreciará que las condiciones del cultivo bi o tridimensional son tales que permiten la expansión de las células adherentes.

Como se usa en esta memoria los términos "que expande" y "expansión" se refieren al mantenimiento de esencialmente menos diferenciación de las células y finalmente al crecimiento celular, es decir, aumento de una población celular (por ejemplo, al menos 2 veces) sin diferenciación que acompañe a dicho aumento.

55 Como se usa en esta memoria los términos "que mantiene" y "mantenimiento" se refieren a renovación celular esencialmente de menos diferenciación, es decir, población celular esencialmente estacionaria sin diferenciación que acompañe dicha estacionalidad.

Para el cultivo 2D, el sembrado de células de placenta se efectúa típicamente a una densidad de cultivo de $3 \pm 0,2 \times 10^3$ células/cm². Después del sembrado, los cultivos celulares se cultivan normalmente en una incubadora de cultivo tisular bajo condiciones humidificadas con CO₂ al 5% a 37°C.

5 Según una realización de la presente invención, las células se hacen crecer en un medio de cultivo desprovisto de suplementos antibióticos desde al menos el pase 2, al menos el pase 3, o al menos el pase 4.

Según una realización de la presente invención, las células se hacen pasar por al menos 4 pases, al menos 5 pases, al menos 6 pases, al menos 7 pases o al menos 8 pases. Se apreciará que las células se hacen pasar típicamente cuando el cultivo alcanza aproximadamente el 70-90% de confluencia, típicamente después de 3-5 días (por ejemplo, 1-3 doblajes).

10 Para el cultivo 3D, las células adherentes pueden transferirse a una matriz configurada en 3D inmediatamente después del aislamiento o de forma alternativa, pueden pasarse a disposiciones tridimensionales después de condiciones bidimensionales (2D). En algunos momentos, puede necesitarse la crioconservación de células entre el cultivo 2D y el cultivo 3D.

15 Así, el material adherente según algunas realizaciones se configura para el cultivo 3D proporcionando así una matriz de crecimiento que aumenta esencialmente la superficie de unión disponible para la adherencia de las células para así imitar la infraestructura del tejido (es decir, la placenta).

Para producción a gran escala, el cultivo puede efectuarse en un biorreactor 3D.

20 Ejemplos de dichos biorreactores incluyen, aunque no están limitados a, un biorreactor de flujo de pistón, un biorreactor de tanque agitado continuo, un biorreactor de lecho estacionario (biorreactor de lecho empaquetado) y un biorreactor de lecho fluidizado.

25 El biorreactor Celligen (New Brunswick Scientific) es capaz de expansión 3D de células adherentes bajo condiciones controladas (por ejemplo, pH, temperatura y niveles de oxígeno) y con perfusión en medio de crecimiento celular constante. Además, los cultivos celulares pueden monitorizarse para niveles de concentración de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio. La velocidad de consumo de glucosa y la velocidad de formación de lactato de las células adherentes permiten medir la velocidad de crecimiento celular y determinar el tiempo de cosechado.

30 Otros biorreactores 3D que pueden usarse con la invención incluyen, aunque no están limitados a, un biorreactor de tanque agitado en continuo, donde un medio de cultivo se alimenta de forma continua en el biorreactor y el medio usado se saca de forma continua, para mantener un estado continuo constante en el tiempo en el biorreactor. El biorreactor de tanque agitado puede usarse con lecho fluidizado (vehículos suspendidos) o una cesta de lecho fibroso (que está disponible por ejemplo en New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ), un biorreactor de lecho estacionario, un biorreactor de agitación por aire, donde el aire se alimenta típicamente en el fondo de un tubo de aspiración central que fluye hacia arriba mientras se forman burbujas, y que separa el gas de escape en la parte superior de la columna, un biorreactor con espumas poliactivas [como se describe en Wendt, D. et al., Biotechnol Bioeng 84: 205-214, (2003)], unos soportes porosos en un biorreactor de perfusión de flujo radial [como se describe en Kitagawa et al., Biotechnology and Bioengineering 93(5): 947-954 (2006)], un biorreactor de flujo radial con soporte o vehículos, un biorreactor de fibra hueca y microvehículos. Otros biorreactores que pueden usarse de acuerdo con la invención se describen en las Patentes de EE.UU. núms. 6.277.151, 6.197.575, 6.139.578, 6.132.463, 5.902.741 y 5.629.186.

40 En una realización ejemplar se siembran un total de $200 \pm 100 \times 10^6$ células, se siembran $3-10 \times 10^6$ células/gr de vehículo, o se siembran $0,06-0,2 \times 10^6$ células/ml. Según una realización ejemplar, el sembrado de células se efectúa en discos FibraCel de 2000-9000 células/cm².

Las células pueden cosecharse cuando al menos aproximadamente el 10% de células están proliferando mientras se evita la diferenciación incontrolada y la senescencia.

45 El cultivo se efectúa durante al menos aproximadamente 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 14 días, 20 días, un mes o incluso más. Se apreciará que el cultivo en un biorreactor puede prolongar este periodo. El cultivo de las células adherentes en el cultivo 3D pueden efectuarse bajo un flujo continuo de un medio de cultivo. El paso puede efectuarse además para aumentar el número de células. Se apreciará que el medio de cultivo puede cambiarse para prolongar y mejorar las condiciones de cultivo.

50 Según una realización de la presente invención, el cultivo celular se efectúa bajo perfusión del medio de cultivo. Típicamente, la velocidad de perfusión se determina por la concentración de glucosa en el medio de cultivo de las células adherentes. Así, según las presentes enseñanzas, el medio de cultivo puede cambiarse cuando la concentración de glucosa es aproximadamente 500 mg/L, aproximadamente 550 mg/L o aproximadamente 600 mg/L.

Las células adherentes de algunas realizaciones de la presente invención comprenden al menos aproximadamente 10%, 28%, 30%, 50%, 80% o más células proliferativas (como puede ensayarse por FACS que monitoriza las fases S y G2/M).

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

Como se usa en esta memoria "un fenotipo de célula estromal" se refiere a un fenotipo estructural o funcional típico de una célula estromal derivada de médula ósea (es decir, mesenquimal).

10 Así, por ejemplo, las células pueden tener una forma de huso. De forma alternativa o adicional las células pueden expresar un marcador o una colección de marcadores (por ejemplo, marcador de superficie) típico de las células estromales. Ejemplos de marcadores de superficie celular estromal (positivos y negativos) incluyen aunque no están limitados a CD105⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, D7-fib⁺, CD3⁻, CD4⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD80⁻, CD5⁻, CD20⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD79⁻, HLA-DR⁻, CD31⁻ KDR⁻, y FMC7.

Otros marcadores de célula estromal incluyen aunque no están limitados a tirosina hidroxilasa, nestina y H-NF.

15 Según una realización específica de la invención, las células adherentes, que incluyen las derivadas tanto de una parte materna como de una parte fetal de la placenta, no expresan el marcador de célula madre CD271.

Como se usa en esta memoria la frase "célula madre" se refiere a una célula que no está diferenciada de forma terminal.

20 Según una realización específica de la invención, las células adherentes derivadas de una parte fetal de la placenta (por ejemplo, que consiste en o comprende vellosidades coriónicas) se caracterizan por una expresión CD200 positiva (véase la sección de Ejemplos que sigue).

Según una realización específica de la invención, no más del 3,5%, no más del 3%, no más del 2% o no más del 1% de las células adherentes de una parte materna expresan CD200 como se mide por citometría de flujo usando un control de isotipo para definir la expresión negativa.

25 Ejemplos de fenotipos funcionales típicos de células estromales incluyen, aunque no están limitados a, actividad de supresión de célula T (no estimulan las células T y en cambio suprimen las mismas, por ejemplo, cuando se ensaya en un cultivo de linfocito mixto) y actividad de soporte de célula madre hematopoyética.

30 Según una realización ejemplar, las células adherentes de la presente invención están menos comprometidas a la diferenciación en líneas osteogénica o adipogénica en comparación con células adherentes de la médula ósea que crecen y se diferencian bajo las mismas condiciones. Por ejemplo, según una realización ejemplar, las células adherentes de la presente invención no se diferencian en líneas osteogénica o adipogénica cuando se hacen crecer bajo las condiciones descritas en los Ejemplos 4-7 del documento WO2010026575.

Según una realización de la invención, las células adherentes de la invención son capaces de suprimir la reacción inmune en un sujeto.

35 Como se usa en esta memoria la frase "que suprime la reacción inmune en un sujeto" se refiere a la disminución o inhibición de la reacción inmune que se da en un sujeto en respuesta a un antígeno (por ejemplo, una célula extraña o una parte de la misma). La respuesta inmune que puede suprimirse mediante las células adherentes incluyen las respuestas inmunes humorales, y las respuestas inmunes celulares, que implican el reconocimiento específico de antígenos de patógeno por medio de anticuerpos y linfocitos T (proliferación de células T), respectivamente. Algunos ejemplos de métodos para determinar si las células adherentes suprimen una reacción inmune se dan en los
40 Ejemplos.

45 Según una realización específica, las células adherentes de placenta materna son capaces de suprimir una reacción inmune a una menor extensión (por ejemplo, al menos aproximadamente 2% menos, 5% menos, 10% menos, 15% menos, 20% menos, 30% menos, 40% menos o 50% menos) que las células adherentes de una parte fetal de placenta. En algunas realizaciones, la supresión de una reacción inmune se determina midiendo la capacidad de las células para suprimir un cultivo de linfocitos mixto. En otras realizaciones, la supresión de una reacción inmune se determina midiendo la supresión de la formación de blastos de célula T inducida por fitohemaglutinina (PHA) en un ensayo *in vitro*.

50 Según una realización específica, las células adherentes de placenta materna comprenden un diámetro celular que es menor (por ejemplo, en aproximadamente 2%, 5%, 10%, 15%, 20 o 30%) que el de las células adherentes derivadas de una parte fetal de la placenta.

Según una realización específica, las células adherentes de placenta materna comprenden una capacidad de proliferación celular (por ejemplo, en aproximadamente 2%, 5%, 10%, 15%, 20 o 30%) que es mayor que el de las células adherentes derivadas de una parte fetal de la placenta.

Según una realización específica las células pueden ser de fuente autóloga, singénica, alogénica o xenogénica.

Según otra realización específica las células pueden modificarse genéticamente para expresar una proteína heteróloga.

Según aún otra realización específica las células no están genéticamente modificadas.

5 Se apreciará que el medio acondicionado puede aislarse de cultivos que comprenden/consisten en las células.

Como se usa en esta memoria "medio acondicionado" se refiere a un medio enriquecido con factores secretados presentes en los cultivos descritos en esta memoria (es decir, que comprende/consiste en cualquiera de las poblaciones celulares anteriores) después de un cierto periodo de cultivo.

10 El medio acondicionado se produce cultivando las células anteriores en un medio de crecimiento bajo condiciones adecuadas para producir el medio acondicionado.

15 El medio de crecimiento puede ser cualquier medio de crecimiento adecuado para hacer crecer las células de placenta adherentes de la presente invención, como se describe anteriormente. El medio de crecimiento puede suplementarse con factores nutricionales, tales como aminoácidos, (por ejemplo, L-glutamina), anti-oxidantes (por ejemplo, beta-mercaptoetanol) y factores de crecimiento. El suero y/o sustituciones de suero se añaden a intervalos de concentración efectivos de hasta 20%.

20 Las células se cultivan en el medio de crecimiento durante tiempo suficiente para permitir la acumulación adecuada de factores secretados para soportar la inmunosupresión y/o angiogénesis, por ejemplo. Típicamente, el medio se acondiciona cultivando durante 1-5 días a 37°C. Sin embargo, el periodo de cultivo puede escalarse evaluando el efecto del medio acondicionado en la inmunosupresión y/o angiogénesis, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos. En algunas realizaciones, el medio se acondiciona durante 3-5 días para la inmunosupresión y durante 24-72 hrs para la angiogénesis.

25 La selección del aparato de cultivo para acondicionar el medio se basa en la escala y el propósito del medio acondicionado. La producción a gran escala implica preferiblemente el uso de biorreactores como se describe anteriormente. Después de la acumulación de factores adecuados en el medio, el medio de crecimiento (es decir, el medio acondicionado) se separa de las células y se recoge. Se apreciará que las células pueden usarse de forma repetida para acondicionar cargas adicionales de medio durante periodos de cultivo adicionales, con tal que las células retengan su capacidad para acondicionar el medio.

30 El medio acondicionado de la presente invención puede administrarse directamente (como se describe adicionalmente a continuación) o extraerse para concentrar el factor efectivo tal como por filtración de sal. Para el uso futuro, el medio acondicionado se almacena preferiblemente congelado a -80°C.

Las células adherentes de partes fetales pueden usarse en diversos marcos de investigación tal como para ensayar sus propiedades biológicas (por ejemplo, morfología, tamaño) con respecto a las partes maternas (véase por ejemplo, la sección de Ejemplos).

35 Las poblaciones purificadas de células de la placenta descritas en esta memoria o cualquiera de los medios acondicionados descritos en esta memoria pueden usarse para tratar un defecto de músculo esquelético.

40 Como se usa en esta memoria el término "proceso" se refiere a cualquier patología (enfermedad, proceso, síndrome o trastorno) que puede beneficiarse del trasplante de célula (por ejemplo, célula estromal) u órgano. Los ejemplos incluyen procesos isquémicos, procesos cardiovasculares, procesos del sistema nervioso, procesos de tracto gastrointestinal, procesos ortopédicos, procesos hematopoyéticos, procesos renales y procesos hepáticos, tales como aunque no limitados a, enfermedad arterial periférica (PAD), tal como isquemia de la extremidad e isquemia crítica de la extremidad (CLI), isquemia de la extremidad inferior, enfermedad vascular isquémica, ictus, enfermedad cardíaca isquémica, isquemia de miocardio, infarto de miocardio agudo (MI), enfermedad de la arteria coronaria (CAD), enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad de la arteria coronaria principal izquierda, enfermedad oclusiva arterial, isquemia periférica, enfermedad vascular periférica, arteriosclerosis, retinopatía, 45 reparación de retina, trastorno remodelador, síndrome de von Hippel-Lindau, enfermedad vascular telengiectasiasisquémica hemorrágica hereditaria, enfermedad de Buerger, diabetes, enfermedad vascular del riñón, enfermedad renal isquémica, enfermedad hepática, placenta isquémica, trastornos asociados con la reproducción, enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD), trasplante de órgano sólido, trasplante de célula madre hematopoyética (HSCT), procesos inflamatorios del tracto gastrointestinal (GI), colitis ulcerosa, curado de heridas 50 retrasado, curado de úlceras retrasado, cáncer (por ejemplo, cáncer de mama), pre-cáncer, procesos caracterizados por daño del tejido conectivo tal como cáncer óseo, osteosarcoma, metástasis ósea, fractura ósea, enfermedad degenerativa del disco, osteogénesis imperfecta (OI), quemado, herida por quemado, defecto del cartílago articular, herida profunda, curado de herida retrasado, curado de úlcera retrasado, trastornos metabólicos, psoriasis, dolor neuropático, lesión del nervio periférico, soporte del trasplante de riñón, quiste óseo subcondrial, osteoporosis, 55 osteoartritis (OA), hueso degenerado, daño del cartílago, defecto del cartílago articular, tendones lesionados (por ejemplo, lesiones de tendones inducidos por endurecimiento) y ligamentos lesionados.

La enfermedad/proceso isquémico es un proceso médico en que el tejido cae en un estado isquémico debido a un reducido flujo sanguíneo en la vasculatura provocado por diversos factores, tales como constricción del lumen del vaso sanguíneo, desarrollo de coágulos de sangre, oclusión del vaso sanguíneo, vasculitis, estrechamiento del vaso sanguíneo o un aumento en la viscosidad de la sangre. Las enfermedades isquémicas incluyen trastorno vascular periférico, enfermedad cardíaca isquémica (por ejemplo, cardiomiopatía isquémica, infarto de miocardio, fallo cardíaco isquémico), enfermedad cerebrovascular isquémica, que incluye ictus, enfermedad isquémica del riñón, enfermedad isquémica del pulmón y enfermedades isquémicas asociadas con enfermedades infecciosas. Ejemplos no limitantes adicionales de enfermedades isquémicas (también denominadas en esta memoria como isquemia) se enumeran a lo largo de la solicitud.

- 5
- 10 El trastorno vascular periférico es un proceso médico en que el tejido periférico cae en un estado isquémico debido a un reducido flujo sanguíneo arterial periférico provocado por, por ejemplo, constricción del lumen del vaso sanguíneo, desarrollo de coágulos de sangre, oclusión del vaso sanguíneo, vasculitis, estrechamiento del vaso sanguíneo o un aumento en la viscosidad de la sangre. Enfermedades asociadas con el trastorno vascular periférico incluyen enfermedades oclusivas arteriales crónicas tales como arteriosclerosis obliterante y enfermedad de Buerger
- 15 y esclerosis sistémica progresiva, eritematoso sistémico, enfermedad de Raynaud, síndrome de vibración, aneurisma y vasculitis. Ejemplos no limitantes adicionales de enfermedades isquémicas periféricas se enumeran a lo largo de la solicitud.

Según una realización específica el proceso es defecto del músculo esquelético.

El medio acondicionado descrito en esta memoria se usa para tratar el ictus.

- 20 Como se usa en esta memoria "ictus" o "ataque cerebrovascular agudo" se refiere a la pérdida de desarrollo rápido de la(s) función(ones) cerebral(es) debido a la perturbación en el suministro de sangre al cerebro. Esto puede deberse a isquemia (falta de suministro de glucosa y oxígeno) provocada por trombosis o embolismo o debido a una hemorragia (hemorragia subaracnoide o hemorragia intracerebral).

- 25 Se apreciará que las células de la presente invención son capaces de inducir la inmunosupresión y/o tolerancia y/o son capaces de inducir la angiogénesis en un sujeto. Así, las células adherentes o medios acondicionados derivados de ellas pueden usarse para tratar cualquier proceso que necesite angiogénesis y/o inmunosupresión y/o tolerancia. Dichos procesos incluyen, aunque no están limitados a, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias (que incluyen enfermedades inflamatorias agudas y crónicas) que incluyen, aunque no están limitadas a, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumatoides, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades de tejido conectivo y enfermedades sistémicas.
- 30

- Ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunes incluyen, aunque no están limitadas a aterosclerosis (Matsuura E. et al., *Lupus*. 1998; 7 Supl 2:S135), infarto de miocardio (Vaarala O. *Lupus*. 1998; 7 Supl 2:S132), trombosis (Tincani A. et al., *Lupus* 1998; 7 Supl 2:S107-9), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. et al., *Wien Klin Wochenschr* 25 de Agosto de 2000; 112 (15-16):660), enfermedad autoinmune anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al., *Semin Thromb Hemost*. 2000; 26 (2):157), vasculitis necrotizante de los vasos sanguíneos pequeños, poliangiitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrotizante y crescéntica focal pauci-inmune (Noel LH. *Ann Med Interne* (París). Mayo de 2000; 151 (3):178), síndrome antifosfolípido (Flamholz R. et al., *J Clin Apheresis* 1999; 14 (4):171), fallo cardíaco inducido por anticuerpos (Wallukat G. et al., *Am J Cardiol*. 17 de Junio de 1999; 83 (12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann Ital Med Int*. Abril-Junio de 1999; 14 (2):114; Semple JW. et al., *Blood* 15 de Mayo de 1996; 87 (10):4245), anemia hemolítica autoinmune (Efremov DG. et al., *Leuk Lymphoma* Enero de 1998; 28 (3-4):285; Sallah S. et al., *Ann Hematol* Marzo de 1997; 74 (3):139), autoinmunidad cardíaca en enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. et al., *J Clin Invest* 15 de Octubre de 1996; 98 (8):1709) y autoinmunidad de linfocito T anti-ayudante (Caporossi AP. et al., *Viral Immunol* 1998; 11 (1):9).
- 35
- 40
- 45

Ejemplos de enfermedades reumatoides autoinmunes incluyen, aunque no están limitados a artritis reumatoide (Krenn V. et al., *Histol Histopathol* 1 de Julio de 2000; 15 (3):791; Tisch R, McDevitt HO. *Proc Natl Acad Sci units S A* 18 de enero de 1994; 91(2):437) y espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel et al., *Arthritis Res* 2001; 3 (3): 189).

- 50 Ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunes incluyen, aunque no están limitados a, enfermedad pancreática, diabetes tipo I, enfermedad de tiroides, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopática, autoinmunidad de ovario, infertilidad anti-esperma autoinmune, prostatitis autoinmune y enfermedades de síndrome poliglandular autoinmune tipo I incluyen, aunque no están limitadas a enfermedades autoinmunes del páncreas, diabetes tipo I (Castano L. y Eisenbarth GS. *Ann. Rev. Immunol*. 8:647; Zimmet P. *Diabetes Res Clin Pract* Octubre de 1996; 34 Supl:S125), enfermedades tiroideas autoinmunes, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. *Endocrinol Metab Clin North Am* Junio de 2000; 29 (2):339; Sakata S. et al., *Mol Cell Endocrinol* Marzo de 1993; 92 (1):77), tiroiditis autoinmune espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S, *J Immunol* 15 de Diciembre de 2000; 165 (12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., *Nippon Rinsho* Agosto de 1999; 57 (8):1810), mixedema idiopática (Mitsuma T. *Nippon Rinsho*. Agosto de 1999; 57 (8):1759),
- 55

- autoinmunidad de ovario (Garza KM. et al., *J Reprod Immunol* Febrero de 1998; 37 (2):87), infertilidad anti-esperma autoinmune (Diekman AB. et al., *Am J Reprod Immunol*. Marzo de 2000; 43 (3):134), prostatitis autoinmune (Alexander RB. et al., *Urology* Diciembre de 1997; 50 (6):893) y síndrome poliglandular autoinmune tipo I (Hara T. et al., *Blood*. 1 de Marzo de 1991; 77 (5):1127).
- 5 Ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunes incluyen, aunque no están limitados a, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (García Herola A. et al., *Gastroenterol Hepatol*. Enero de 2000; 23 (1):16), enfermedad celíaca (Landau YE. y Shoenfeld Y. *Harefuah* 16 de Enero de 2000; 138 (2):122), colitis, ileitis y enfermedad de Crohn.
- Ejemplos de enfermedades cutáneas autoinmunes incluyen, aunque no están limitados a, enfermedades de piel bullosa autoinmune, tales como, aunque no están limitadas a, pénfigo vulgar, pénfigoide buloso y pénfigo foliáceo.
- 10 Ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunes incluyen, aunque no están limitados a, hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmune (Franco A. et al., *Clin Immunol Immunopathol* Marzo de 1990; 54 (3):382), cirrosis biliar primaria (Jones DE. *Clin Sci (Colch)* Noviembre de 1996; 91 (5):551; Strassburg CP. et al., *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Junio de 1999; 11 (6):595) y hepatitis autoinmune (Manns MP. *J Hepatol* Agosto de 2000; 33 (2):326).
- 15 Ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunes incluyen, aunque no están limitados a, esclerosis múltiple (Cross AH. et al., *J Neuroimmunol* 1 de Enero de 2001; 112 (1-2):1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. et al., *J Neural Transm Supl*. 1997; 49:77), miastenia grave (Infante AJ. y Kraig E, *Int Rev Immunol* 1999; 18 (1-2):83; Oshima M. et al., *Eur J Immunol* Diciembre de 1990; 20 (12):2563), neuropatías, neuropatías motoras (Kornberg AJ. *J Clin Neurosci*. Mayo de 2000; 7 (3):191); síndrome de Guillain-Barre y neuropatías autoinmunes (Kusunoki S. *Am J Med Sci*. Abril de 2000; 319 (4):234), miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. *Am J Med Sci*. Abril de 2000; 319 (4):204); enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelar paraneoplásica y síndrome de la persona rígida (Hiemstra HS. et al., *Proc Natl Acad Sci units S A* 27 de Marzo de 2001; 98 (7):3988); síndrome de la persona rígida no paraneoplásica, atrofia cerebelares progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunes (Antoine JC. y Honnorat J. *Rev Neurol (París)* Enero de 2000; 156 (1):23); neuropatías disímunes (Nobile-Orazio E. et al., *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Supl* 1999; 50:419); neuromiotonia adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. et al., *Ann N Y Acad Sci*. 13 de Mayo de 1998; 841:482), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Mayo de 1994; 57 (5):544) y enfermedades neurodegenerativas.
- 20
- 25
- 30 Ejemplos de enfermedades musculares autoinmunes incluyen, aunque no están limitados a, miositis, miositis autoinmune y síndrome de Sjogren primario (Feist E. et al., *Int Arch Allergy Immunol* Septiembre de 2000; 123 (1):92) y enfermedad autoinmune de músculo liso (Zauli D. et al., *Biomed Pharmacother* Junio de 1999; 53 (5-6):234).
- 35 Ejemplos de enfermedades néfricas autoinmunes incluyen, aunque no están limitados a, nefritis y nefritis intersticial autoinmune (Kelly CJ. *J Am Soc Nephrol* Agosto de 1990; 1 (2):140).
- Ejemplos de enfermedades autoinmunes relacionadas con la reproducción incluyen, aunque no están limitados a, pérdida fetal repetida (Tincani A. et al., *Lupus* 1998; 7 Supl 2:S107-9).
- 40 Ejemplos de enfermedades de tejido conectivo autoinmunes incluyen, aunque no están limitados a, enfermedades de oído, enfermedades de oído autoinmunes (Yoo TJ. et al., *Cell Immunol* Agosto de 1994; 157 (1):249) y enfermedades autoinmunes del oído interno (Gloddek B. et al., *Ann N Y Acad Sci* 29 de Diciembre de 1997, 830:266).
- Ejemplos de enfermedades sistémicas autoinmunes incluyen, aunque no están limitados a, lupus sistémico eritematoso (Erikson J. et al., *Immunol Res* 1998; 17 (1-2):49) y esclerosis sistémica (Renaudineau Y. et al., *Clin Diagn Lab Immunol*. Marzo de 1999; 6 (2):156); Chan OT. et al., *Immunol Rev* Junio de 1999; 169:107).
- 45 Además, las células adherentes o medios acondicionados pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con trasplante de un injerto que incluyen, aunque no están limitados a, rechazo de injerto, rechazo crónico de injerto, rechazo sub-agudo de injerto, rechazo hiperagudo de injerto, rechazo agudo de injerto y enfermedad de injerto frente a huésped.
- 50 Como se usa en esta memoria el término "tratar" se refiere inhibir o frenar el desarrollo de una patología y/o provocar la reducción, remisión o regresión de una patología. Los expertos en la técnica entenderán que varias metodologías y ensayos pueden usarse para evaluar el desarrollo de una patología, y de forma similar, varias metodologías y ensayos pueden usarse para evaluar la reducción, remisión o regresión de una patología. El término "tratar" puede referirse también a aliviar o disminuir un síntoma asociado con la patología.
- 55 El sujeto tratado mediante las células adherentes o medios acondicionados puede ser cualquier sujeto (por ejemplo, un mamífero), tal como un sujeto humano o un animal doméstico que incluyen, aunque no está limitado a, caballos

(es decir, equino), ternera, cabra, oveja, cerdo, perro, gato, camello, alpaca, llama y yak que se diagnostica con o sufre de la patología y puede beneficiarse del trasplante de célula estromal.

Como se menciona las células pueden ser ingenuas o pueden modificarse genéticamente como para derivar una línea de interés (véase Sol. Pat. de EE.UU. núm. 20030219423).

5 Las células pueden ser preparados frescos o congelados (por ejemplo, crio-conservados).

Dependiendo del proceso médico, el sujeto puede administrarse con fármacos químicos adicionales (por ejemplo, inmunomodulatorio, quimioterapia, etc.) o células.

10 Las células, aunque caracterizadas por actividad inmuno-supresora, pueden provocar aún respuesta inmune indeseable derivada de huésped o donante. Se han desarrollado aproximaciones para reducir la probabilidad de rechazo de células no autólogas. Estos incluyen o bien suprimiendo el sistema inmune recipiente o encapsular las células no autólogas en membranas semipermeables, inmunoaislantes antes del trasplante.

Las técnicas de encapsulado se clasifican generalmente como microencapsulado, que implica pequeños vehículos esféricos y macroencapsulado, que implica membranas mayores de lámina plana y de fibra hueca (Uludag, H. et al. Technology of mammalian cell encapsulation. Adv Drug Deliv Rev. 2000; 42: 29-64).

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

20 Por ejemplo, las microcápsulas se preparan complejando colágeno modificado con una carcasa de ter-polímero de metilacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), ácido metacrílico (MAA) y metacrilato de metilo (MMA), que da por resultado un espesor de cápsula 2-5 µm. Dichas microcápsulas pueden encapsularse adicionalmente con carcasas de ter-polímero de 2-5 µm adicionales para impartir una superficie suave cargada de forma negativa y para minimizar la absorción de proteína en plasma (Chia, S.M. et al. Multi-layered microcapsules for cell encapsulation Biomaterials. 2002 23: 849-56).

Otras microcápsulas están basadas en alginato, un polisacárido marino (Sambanis, A. Encapsulated islets in diabetes treatment. Diabetes Technol. Ther. 2003, 5: 665-8) o sus derivados. Por ejemplo, las microcápsulas pueden prepararse mediante la complejación de polielectrolito entre los polianiones de alginato sódico y sulfato de celulosa sódico con el polication hidrocioruro de poli(metileno-co-guanidina) en presencia de un cloruro de calcio.

30 Se apreciará que la encapsulación celular se mejora cuando se usan cápsulas más pequeñas. Así, el control de calidad, estabilidad mecánica, propiedades de difusión y actividades *in vitro* de células encapsuladas mejoraron cuando el tamaño de cápsula se redujo de 1 mm a 400 µm (Canaple L. et al., Improving cell encapsulation through size control. J Biomater Sci Polym Ed. 2002; 13:783-96). Además, las biocápsulas nanoporosas con tamaño de poro bien controlado tan pequeño como 7 nm, ajustaron las químicas superficiales y se encontró que las microarquitecturas precisas inmunoaislaron con éxito los microambientes para las células (Williams D. Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices. Med Device Technol. 1999, 10: 6-9; Desai, T.A. Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation. Expert Opin Biol Ther. 2002, 2: 633-46).

40 Ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, aunque no están limitados a, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxicloloroquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE), etanercept, alfa bloqueantes de TNF, un agente biológico que dirige una citoquina inflamatoria y Fármaco Anti-inflamatorio No Esteroideo (NSAIDs). Ejemplos de NSAID incluyen, aunque no están limitados a ácido acetilsalicílico, salicilato de magnesio colina, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato sódico, diclofenac, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, cetoprofeno, ceterolac, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina, acetaminofeno, ibuprofeno, inhibidores de Cox-2 y tramadol.

Además, se apreciará que las células o medios acondicionados pueden administrarse o bien *per se* o, preferiblemente como una parte de la composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 Como se usa en esta memoria una "composición farmacéutica" se refiere a un preparado de las células o medios acondicionados derivados de ellas, con otros componentes químicos tales como vehículos o excipientes farmacéuticamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de las células a un sujeto.

En adelante, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o un diluyente que no provoca irritación significativa a un sujeto y no abole la actividad biológica y propiedades del compuesto

administrado. Los ejemplos, sin limitaciones, de vehículos son propilenglicol, solución salina, DMSO, HSA, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

5 En esta memoria el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

10 Las composiciones farmacéuticas para el uso según la invención pueden formularse así de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesado de los ingredientes activos en preparados que, pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada es dependiente de la ruta de administración elegida.

15 Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tal como disolución de Hank, disolución de Ringer, tampón de sal fisiológica, o medio de congelación que contiene criopreservantes.

La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está bien en la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en esta memoria.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en esta memoria pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales.

20 Dependiendo de la gravedad y sensibilidad del proceso a tratar, la dosificación puede ser de una única administración o una pluralidad de administraciones. Sin embargo, la cantidad de una composición a administrar será dependiente, por supuesto, del sujeto que se trata, la gravedad de la afección, la manera de administración, el juicio del médico que prescribe, etc.

25 Después del trasplante, una parte de las células de la invención preferiblemente sobrevive en el área enferma durante un periodo de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 2-6 semanas), de manera que se observa un efecto terapéutico.

Las composiciones que incluyen el preparado de la invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible pueden prepararse también, colocarse en un recipiente apropiado y marcarse para el tratamiento de un proceso indicado.

30 Las composiciones para el uso de la invención pueden presentarse, si se desea, en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, lámina metálica o plástica, tal como un paquete de blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para la administración. El paquete o dispensador puede adaptarse también mediante una nota asociada con el recipiente en la forma recetada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o venta de compuestos farmacéuticos, cuya nota es reflejo de aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Dicha nota, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la Administración de Alimentación y Fármacos de EE.UU. para fármacos de prescripción o de una inserción de producto aprobado.

Como se usa en esta memoria el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

40 Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significa "que incluyen aunque no están limitados a". Este término abarca los términos "que consisten en" y "que consisten esencialmente en".

45 La frase "que consiste esencialmente en" significa que la composición o método puede incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero solo si los ingredientes y/o etapas adicionales no alteran de forma natural las características básicas y nuevas de la composición o método reivindicado.

Como se usa en esta memoria, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, que incluyen mezclas de los mismos.

50 A lo largo de esta solicitud, varias realizaciones de esta invención puede presentarse en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente para conveniencia y brevedad y no debería construirse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, la descripción de un intervalo debería considerarse que ha descrito específicamente todos los subintervalos posibles además de valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 debería considerarse que ha descrito específicamente subintervalos tal como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4,

de 2 a 6, de 3 a 6, etc., además de números individuales en el intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto aplica a pesar de la anchura del intervalo.

5 Cuando un intervalo numérico se indica en esta memoria, significa que incluye cualquier número citado (fraccional o integral) en el intervalo indicado. Las frases "que oscila/oscila entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que oscila/oscila de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en esta memoria de forma intercambiable y se pretende incluir el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionales e integrales entre medias.

10 Como se usa en esta memoria, el término "método" se refiere a las formas, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada que incluyen, aunque no están limitados a, las formas, medios, técnicas y procedimientos o bien conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Como se usa en esta memoria, el término "que trata" incluye abolir, inhibir esencialmente, ralentizar o invertir la progresión de un proceso, mejorar esencialmente los síntomas clínicos o estéticos de un proceso o evitar esencialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de un proceso.

15 La palabra "ejemplar" se usa en esta memoria para indicar "que sirve como un ejemplo, caso o ilustración". Cualquier realización descrita como "ejemplar" no se va a construir necesariamente como preferida o ventajosa sobre otras realizaciones y/o excluir la incorporación de características de otras realizaciones.

20 La palabra "opcionalmente" se usa en esta memoria para indicar que "se proporciona en algunas realizaciones y no se proporciona en otras realizaciones". Cualquier realización particular de la invención puede incluir una pluralidad de características "opcionales" a menos que dichas características difieran.

25 Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, pueden proporcionarse también en combinación en una única realización. Contrariamente, diversas características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, pueden proporcionarse también de forma separada o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de varias realizaciones no se van a considerar características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperativa sin esos elementos.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención como se delinear anteriormente y como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

30 Ejemplos

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran algunas realizaciones de la invención en un modo no limitante.

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

55

Ejemplo 1

Recuperación y procesado de células adherentes a partir de la placenta

Aislamiento de células estromales adherentes (ASC) - Las placentas humanas a término se obtuvieron después de cesáreas de madres donantes sanas después de consentimiento informado.

- 5 El tejido picado de la placenta se incubó durante 2-5 horas a 37°C con 0,1% de colagenasa (1 mg de colagenasa/ml de tejido). Se añadió medio celular bidimensional (2D) (Medio 2D que comprende DMEM suplementado con FBS al 10%, 0,25 µg/ml de fungizona y 50 µg/ml de gentamicina) y el tejido digerido se filtró bruscamente a través de un colador metálico estéril, se recogió en un vaso de precipitados estéril y se centrifugó (10 minutos, 1200 RPM, 4°C). Usando pipeteado suave, las células suspendidas se diluyeron entonces con medio 2D suplementado con antibióticos, se sembraron en matraces de 175 cm² y se incubaron a 37°C en una incubadora de cultivo de tejido bajo condiciones humidificadas suplementado con 5% de CO₂. Después de 2-3 días, en que las células se dejaron adherirse a la superficie del matraz, se lavaron con PBS y se añadió medio 2D.

- 15 Crecimiento celular bidimensional (2D) - El primer pase se llevó a cabo típicamente después de 7-15 días. Empezando en el pase 2 y continuando hasta el pase 6-8, las células se pasaron cuando el cultivo alcanzó el 70-90% de confluencia, normalmente después de 4-5 días (1,5-2 doblajes). Las células se separaron de los matraces usando tripsina-EDTA al 0,25% (4 minutos a 37°C) y se sembraron en una densidad de cultivo de $4 \pm 0,5 \times 10^3$ células/cm². A lo largo del proceso, los cultivos se hicieron crecer en una incubadora de cultivo de tejido bajo condiciones humidificadas con 5% de CO₂ a 37°C. Después de un total de 5-9 pases las células se recogieron y crioconservaron.

- 20 Procedimiento de crioconservación para producto de existencias de células 2D - Para la crioconservación de existencias de células 2D, las células cultivadas en 2D se recogieron bajo condiciones asépticas usando tripsina-EDTA al 0,25%. Las células se centrifugaron (1200 RPM, 10', 4°C), se contaron y se suspendieron de nuevo en medio 2D.

- 25 Para congelación, las suspensiones celulares se diluyeron 1:1 con mezcla de congelación 2D (las concentraciones finales fueron DMSO al 10%, FBS al 40% y medio 2D al 50%). Las células se almacenaron a una concentración final de 10×10^6 /ml en viales de polipropileno de crioconservación de 5 ml. Los viales se etiquetaron y se transfirieron a un congelador a velocidad controlada para un proceso de reducción de temperatura graduado (1°C/min), después de lo cual se transfirieron a almacenaje en fase gaseosa de un congelador de nitrógeno líquido.

- 30 Detalles adicionales que afectan al aislamiento y cultivo de ASC de placenta bajo condiciones 2D y 3D se encuentran en las siguientes referencias. El documento WO2007/108003, describe condiciones de cultivo tridimensionales (3D) adecuadas para la expansión de ASC derivados de placenta. El documento WO2009/037690, enseña métodos para tratar la isquemia e inducir la regeneración del tejido conectivo administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de células adherentes de un tejido seleccionado de un grupo que consiste en una placenta y un tejido adiposo. El documento WO2010/026574 describe condiciones de cultivo bidimensionales (2D) adecuadas para la expansión de ASC derivados de placenta. El documento WO2010/026575 describe condiciones de cultivo tridimensionales (3D) que implican la perfusión que son adecuadas para la expansión de ASC derivadas de placenta.

Ejemplo 2

Aislamiento y caracterización de fracciones de placenta

- 40 I. Aislamiento de células adherentes de diferentes partes de placenta

Materiales y métodos

Placenta - Las placentas humanas a término se obtuvieron después de cesáreas de fetos macho a partir de madres donantes sanas después del consentimiento informado.

Aislamiento celular (para ilustración estructural véase la Figura 1)

- 45 Aislamiento celular desde la membrana amniótica - La placenta se colocó con el lado fetal mirando hacia arriba. La membrana amniótica (avascular) se separó de la membrana coriónica mediante un pelado mecánico romo. La membrana amniótica se transfirió a un tubo de 50 ml que contenía soluciones salinas equilibradas de Hank (HBSS). La membrana se cortó en pedazos de ~0,5-1 cm² y se colocó en un nuevo tubo de 50 ml.

- 50 Aislamiento celular a partir de la parte decidua - Esta etapa se realizó después de la eliminación de la membrana amniótica como se detalla anteriormente. La placenta se colocó con el lado materno mirando hacia arriba. La decidua se diseccionó solo desde la región central de la superficie que mira al lado materno (véase la Figura 1). Se cortaron cuadrados de ~1 cm³ de profundidad de no más de 0,5 cm. Los trozos se colocaron en una botella de 500 ml que contenía HBSS y se lavaron con HBSS.

5 Aislamiento celular a partir de la parte de vellosidad coriónica - Esta etapa se realizó después de la eliminación de la parte decidua como se detalla anteriormente. La placenta se colocó de nuevo con el lado fetal mirando hacia arriba. Se cortaron cuadrados de ~4-5 cm³ entre los vasos sanguíneos grandes a una profundidad de ~0,5-1 cm. Cada trozo se colocó en un plato de vidrio estéril y se restregó con un escalpelo. La vellosidad (pequeños vasos sanguíneos) se separó y solo el tejido circundante se recogió sin la capa de membrana amniótica de corión. El tejido picado se colocó en una botella de 500 ml que contenía HBSS y se lavó con HBSS.

Aislamiento de células adherentes - El tejido picado de las diversas regiones de placenta obtenido como se describe anteriormente se procesó como se describe para la preparación de células PLX anterior.

10 Determinación del origen celular - Para determinar si las células obtenidas de las diversas regiones de placenta después de las condiciones de aislamiento y expansión como se describe anteriormente son de origen materno o fetal, un análisis FISH se realizó en las células derivadas según este protocolo de 5 placentas obtenidas de recién nacidos macho. Las células de origen materno son necesariamente XX (cariotipo hembra) mientras que las células de origen fetal son necesariamente XY (cariotipo macho). Los resultados se resumen en la Tabla 1, posterior.

Tabla 1 - Cariotipo

Carga núm.	Pase número	Fuente de células	Ensayo de FISH		Fuente de células	Ensayo de FISH		Fuente de células	Ensayo de FISH	
			XX	XY		XX	XY		XX	XY
P070109	4-5		70%	30%		0%	100%		20%	81%
P190109	5		99%	1%		0%	100%		1%	99%
P150609	5	Decidua	96%	4%	Vellosidad	0%	100%	Amnios	10%	90%
P290609	5		99%	1%		8%	92%		0%	100%
P050809	5		98%	2%		27%	74%		1%	99%

15 Los resultados demuestran claramente que las células derivadas de decidua están enriquecidas por células maternas (XX), mientras que las células derivadas de la vellosidad y la membrana amniótica están enriquecidas por células fetales (XY).

II. Caracterización de células adherentes de diferentes partes de placenta

20 Morfología celular

La morfología y tamaño (en diámetro) de las células obtenidas de las diferentes regiones de placenta como se describe anteriormente se examinó durante la expansión celular. Las células se cultivaron en DMEM (glucosa baja) que incluye FBS al 8% y se pasaron por cinco a siete doblajes de población. Las Figuras 2A-C muestran la morfología de células derivadas de la decidua basal, vellosidad coriónica y membrana amniótica de la placenta. El contraste de fase a ampliación x 40 se usó para todas las figuras. (A): La morfología de células adherentes derivadas de la decidua basal de placenta. (1): 8 días después de aislamiento (pase 0), (2): 13 días después de aislamiento (pase 1), (3): 20 días después de aislamiento (pase 2), (4): 24 días después del aislamiento (pase 3). (B): La morfología de células adherentes derivadas de la placenta de estroma vellosa de la placenta. (1): 13 días después de aislamiento (pase 0), (2): 17 días después del aislamiento (pase 1), (3): 22 días después de aislamiento (pase 2), (4): 31 días después del aislamiento (pase 4). (C): La morfología de células adherentes derivadas de membrana amniótica de placenta. (1): 3 días después de aislamiento (pase 0), (2): 20 días después de aislamiento (pase 2), (3): 29 días después de aislamiento (pase 3), (4): 41 días después del aislamiento (pase 5). Los micrográficos de fase mostraron diferencia en la morfología de células derivadas de decidua basal, vellosidad coriónica y membrana amniótica de placenta humana a término. Estos resultados están de acuerdo con las medidas de diámetro celular (como se describe a continuación).

35 Tamaño celular

El tamaño celular (en diámetro) de las células que se originan de las tres partes diferentes de placenta se midió a cada pase usando el analizador celular automatizado Cedex (Roche Innovatis AG). Los resultados se presentan como diámetro celular frente a número de pases: La Figura 3 muestra el diámetro celular promedio de todas las cargas ensayadas entre los pases 2-5.

Los resultados muestran una diferencia significativa en el diámetro celular por pase entre decidua, vellosidad y membrana amniótica. El tamaño celular de células que se originan a partir de decidua, vellosidad y membrana amniótica era 15,5-17, 16,0-18,1 y 18,1-21 respectivamente.

Velocidad de doblaje de población de las células

- 5 En cada pase las células se contaron y la velocidad de doblaje de población por día se calculó según la ecuación 1:

Ecuación 1

$\text{Log (células viables totales en la cosecha/células viables totales en la siembra)/días de cultivo}$

La velocidad de PD promedio de células derivadas de la decidua, membrana amniótica y vellosidad a través de los pases 1 a 5 se presenta en la Figura 4.

- 10 La velocidad de proliferación de células derivadas de decidua basal es significativamente mayor que la de las células derivadas de vellosidad coriónica y membrana amniótica de placenta. La proliferación de células de membrana amniótica se ralentiza dramáticamente entre los pases 2-4, mientras que más allá del pase 4 hay una tendencia de mejora en la proliferación celular.

Inmunofenotipo

- 15 Análisis FRCS de marcadores de membrana - las células se tizaron con anticuerpos monoclonales. Brevemente, se suspendieron 400.000-600.000 células en 0,1 ml de tampón de citómetro de flujo en un tubo de ensayo de 5 ml y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA), en la oscuridad, con cada uno de los anticuerpos monoclonales presentes en la Tabla 2, a continuación. Las células se lavaron dos veces con tampón de citómetro de flujo, se suspendió de nuevo en 500 µl de tampón de citómetro de flujo y se analizó por citometría de flujo usando un citómetro de flujo FC-500 (Beckman Coulter). Los controles negativos se prepararon con moléculas de fluorescencia marcados con isótopo.

Tabla 2- Anticuerpos

Anticuerpo	Conjugado de fluorescencia	Fabricante	Número de catálogo
CD45 anti-humano	FITC	IQ Products	IQP-124F
CD105 anti-humano	PE	eBioscience	12-1057-73
CD 19 anti-humano	PE	IQ Products	IQP-515R
CD14 anti-humano	FITC	IQ Products	IQP-143R
CD29 anti-humano	FITC	eBioscience	11-0297
CD73 anti-humano	PE	BD Pharmigen	550257
CD90 anti-humano	PE	BD Pharmigen	555596
CD200 anti-humano	PE	BD Pharmigen	552475

La tabla 3 posterior, delinea los resultados de expresión de marcador.

- 25 Tabla 3 -Expresión de marcador de células adherentes de fuentes celulares diferentes.

Carga núm.	Fuente de células	Pase número	CD105	CD90	CD73	CD29	CD45	CD19	CD14	CD200
PO50809	Vellosidad	5	98,1	95,1	95,7	98,6	0,0	0,4	0,3	57,9
	Decidua	5	99,7	98,4	99,8	99,5	0,1	0,0	0,0	1,2
	Amnios	5	85,1	92,9	79,9	89,1	0,0	0,1	0,1	0,0
P190109	Vellosidad	5	99,43	99,9	99,6	99,7	0,1	0,1	0,0	60
	Decidua	5	99,65	99,4	99,5	99,4	0,0	0,0	0,0	0

	Amnios	5	98,3	99,6	99,3	99,6	0,1	0,1	0,0	44,5
P150609	Vellosidad	5	92,43	86,9	92,1	97,5	19,7	0,0	0,0	16,8
	Decidua	5	99,25	81,7	99,4	99,2	0,1	0,1	0,0	0,3
	Amnios	5	88,02	94,9	96,7	94,9	0,0	0,0	0,0	31,6
P290609	Vellosidad	5	99,6	90,8	98,4	94,6	0,0	0,1	0,2	17,8
	Decidua	5	99,5	94,4	99,3	97,9	0,0	0,0	0,1	1,1
	Amnios	5	98,0	92,0	97,3	91,6	0,3	0,1	0,0	13,0
PO70109	Vellosidad	5	96,06	99,9	96,1	99,1	0,0	0,1	0,0	57,8
	Decidua	5	99,24	99,3	98,7	99,4	0,2	0,0	0,0	3,5
	Amnios	4	86,8	87,0	83,7	82,0	0,6	0,0	0,3	8,6

De nota, las células derivadas de decidua mostraron muy baja expresión de CD200 en comparación a células derivadas de vellosidad y amnios.

III. Propiedades de inmunomodulación *in vitro* de las diversas partes de placenta

- 5 La células mononucleares derivadas humanas (MNC) se aislaron de la sangre periférica. La suspensión de 200.000 MNC por 200 μ l de medio (medio de RPMI 1640 que contiene 20 FBS por 96 pocillos) se estimuló con 10 μ g de PHA/ml (SIGMA) en presencia de 40.000 células que se originan a partir de decidua, vellosidad y membrana amniótica durante 3 días bajo CO₂ al 5% humidificado a 37°C. Se usaron las células derivadas de cuatro placentas diferentes. Tres réplicas de cada grupo se sembraron en platos de 96 pocillos. Durante las últimas 18 hrs del 3^{er} día de cultivo, las células se pulsaron con EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), a una concentración final de 10 μ M.

La proliferación celular se analizó usando el kit Click it (Invitrogen) según el manual.

Los resultados demuestran (Figura 5A) que las tres poblaciones celulares derivadas de 4 placentas diferentes inhiben la proliferación de MNC activada por PHA.

- 15 La velocidad de inhibición promedio (Figura 5B) sugiere un efecto anti-proliferativo más fuerte de células derivadas de membrana amniótica y vellosidad en comparación de células derivadas de decidua.

Ejemplo 3

Propiedades angiogénicas *in vitro* de medios acondicionados derivados (CM) a partir de varias partes de placenta

Procedimientos experimentales

- 20 Las células de placenta de las diversas fracciones se sembraron en el plato de 6 pocillos (0,5 x 10⁶ / pocillo) en 4 ml de medio DMEM suplementado con FCS al 8% durante 24 horas.

Después de 24 h, se eliminó el DMEM, los pocillos se lavaron suavemente con 1 ml de PBS y se sustituyeron con 4 ml de BIO-MPM (Biological Industries) suplementada con fungizona (0,25 μ g/ml) Gentamicina-IKA (45 μ g/ml) ECGS (1 mg/ml) Heparina (5 U/ml) y Glutamina (2 Mm) sin suero. Después de 24 h se recogió el CM y se centrifugó durante 1 minuto en 4600 RPM. El CM se usó o bien fresco o se guardó a -80°C hasta el uso.

- 25 El CM derivado de placenta como se describe anteriormente se añadió a HUVEC (Células endoteliales de la vena umbilical humana) preparadas como sigue:

- 30 15.000 / células por pocillo se descongelaron y se sembraron en platos de 12 pocillos recubiertos de fibronectina con medio M-199 suplementado con FCS al 20% durante 24 horas. El medio se eliminó y se sustituyó con una mezcla de 50% de BIO-MPM totalmente fresco {suplementado con fungizona (0,25 μ g/ml) gentamicina-IKA (45 μ g/ml) ECGS (1 mg/ml) Heparina (5 U/ml) y glutamina (2 Mm) suplementado con FCS al 10%} y 50% de CM derivado de placenta fresco o congelado como se describe anteriormente.

La proliferación de HUVEC se evaluó 72 h después de la adición de CM por el contador celular Cedex automatizado.

Los resultados mostrados en las Figuras 6A-C indican claramente que el CM obtenido de las tres partes de placenta indujeron una elevación en la proliferación de HUVEC en comparación con medio similar no acondicionado BIO-

MPM + medio de suero al 5% e incluso en comparación a M199 + suero al 20% que es el medio de crecimiento estándar utilizado para la expansión de HUVEC.

Ejemplo 4

Modelos *in vivo* para el ensayo de la eficacia terapéutica

5 I. Regeneración del músculo esquelético

La insuficiente regeneración de músculo esquelético post-traumática con eficiencia funcional consecutiva continúa siendo un serio problema en la cirugía ortopédica y traumática. Se han emprendido múltiples esfuerzos para transferir técnicas de ingeniería tisular para mejorar con éxito la regeneración del defecto muscular (Li y Huard 2002; Bach, Beier et al. 2004; Kamelger, Marksteiner et al. 2004; Peng y Huard 2004). La aplicación local de mioblastos en un defecto muscular mejora la regeneración, dando por resultado una mejora de fuerza de contracción de aproximadamente 40% (Arcila, Ameredes et al. 1997; Irintchev, Langer et al. 1997; Saxena, Marler et al. 1999; DeRosimo, Washabaugh et al. 2000). Sin embargo, la transferencia de esta aproximación en la rutina clínica está limitada por morbilidad del sitio donante. El trasplante de células precursoras del músculo autólogo ha mostrado resultados alentadores en el tratamiento de trauma muscular aunque está asociado con significativa morbilidad del sitio donante (Huard, Cao et al. 2003; Deasy, Li et al. 2004; Peng y Huard 2004). El trasplante de células derivadas de médula ósea autólogas en un modelo de rata de trauma romo de músculo esquelético demostró su potencial para mejorar el resultado funcional después de lesión de rotura de músculo esquelético (Matziolis, Winkler et al. 2006). Sin embargo esta aproximación sufre de las desventajas asociadas con el uso de una fuente autóloga de células y el malestar asociado con aspiración de BM.

20 El potencial terapéutico de la población de células descrito en esta memoria en la regeneración de músculo esquelético se evaluó en un modelo de rata de trauma romo de músculo esquelético como se describe por (Matziolis, Winkler et al. 2006).

Protocolo experimental

25 Animales: Ratas Sprague Dawley hembras de aproximadamente 12 semanas de edad de 140-160 g- 10 animales por grupo.

Tratamiento de rata: Rotura del músculo sóleo.

Células: Células de placenta dejadas crecer en cultivo 3D como se describe en el documento WO2010/026575 [en adelante "células PLX"].

30 Preparación celular: Las células PLX criopreservadas se lavaron para eliminar DMSO y albúmina. Las células se suspendieron de nuevo en solución salina y se diluyeron a la concentración deseada (es decir, 5×10^6 en 40 μ l).

Inyección celular:

Inmediatamente después de la lesión (I)

1 semana después de la lesión muscular (DEL)

Dosis celular: $2,5 \times 10^6$.

35 Volumen de inyección: 20 μ l

Evaluación funcional del músculo: 3 semanas después del tratamiento

Biopsias: 3 semanas después del tratamiento

Trauma muscular

40 Los animales se anestesiaron, y la pata trasera inferior se afeitó (Favorita II, Aesculap, Tuttlingen, Alemania) y se desinfectó con povidona-yodo. A través de una incisión longitudinal posterolateral de 2 cm de la piel y por debajo de la fascia desde la cabeza del gemelo lateral al tendón de Aquiles, el músculo sóleo se movilizó y se rompió bruscamente. Para este propósito se usó una abrazadera curvada con puntas rodeada de tubos de polietileno para evitar lesiones de la fascia muscular. El músculo se sujetó con abrazaderas manualmente siete veces su longitud completa con excepción del punto de entrada de las estructuras neurovasculares de suministro, que surgen de la parte media del gemelo medio. Después de irrigaciones múltiples con solución salina, el músculo superficial y la piel se suturaron.

45 Medida de resistencia muscular

Los animales se anestesiaron de nuevo. El nervio ciático y el músculo sóleo se expusieron de forma bilateral protegiendo todas las estructuras neurovasculares. En el lado tratado además del no lesionado, el tendón de Aquiles

se cortó y la extremidad inferior se fijó en el dispositivo de medida de fuerza muscular (Fish, McKee et al. 1989; Racz, Illyes et al. 1997) (Experimetria, Budapest, Hungría). La parte distal del músculo sóleo se conectó al transductor de fuerza a través de una sutura (4-0, seda). Todos los músculos que se insertaron a través del tendón de Aquiles, excepto el músculo sóleo, se cortaron a través de la parte más cercana al tendón de Aquiles. El nervio ciático se estimuló posteriormente con 9 mA/75 Hz bipolar cinco veces, 0,1 s cada uno (8 periodos) con intervalos de 5 s entre los pulsos. Después de esta estimulación de contracción rápida, la resistencia máxima muscular se midió usando un protocolo de estimulación de 9 mA/75 Hz durante cinco veces, 3 s cada una con intervalos de 5 s, alcanzado la tetania en todos los casos. Después de terminar las medidas de resistencia muscular, los animales se sacrificaron. Las fuerzas de contracción bajo estimulación de contracción rápida ("FT") y tetánica ("TET") se compararon para todos los músculos y se visualizaron en dos diagramas de dispersión (músculos lesionados y no lesionados). Todos los valores de fuerza se normalizaron de forma intra-individual frente a los músculos sóleo de control derecho intactos.

Los resultados se muestran en la Figura 7.

Ejemplo de referencia II. Efectos de células expandidas de placenta humana (PLX) en el dolor inflamatorio y neuropático

El dolor neuropático crónico es normal en la práctica clínica. Los pacientes con procesos tan diversos como polineuropatía diabética, neuropatía sensorial por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), síndromes posteriores al ictus, isquemia y esclerosis múltiples, experimentan frecuentemente dolor diario que afecta enormemente su calidad de vida. La gestión del dolor crónico sigue siendo un reto a pesar de los números fármacos que o bien están aprobados o están aún en desarrollo. Aparte de alivio inadecuado, hay preocupaciones sobre efectos secundarios y adicción (Dworkin, Backonja et al. 2003). Durante la inflamación de tejidos periféricos, se producen numerosos mediadores mediante células endoteliales, células residentes y leucocitos que se reclutan al sitio de la lesión. Muchos de estos mediadores (por ejemplo, protones, citoquinas y factor de crecimiento del nervio) se conocen por obtener dolor mediante activación de neuronas aferentes primarias especializadas denominadas nociceptores (Rittner, Brack et al. 2008).

El potencial de la población de células descrito en esta memoria para reducir el dolor se examina en modelos animales para el dolor:

Protocolo experimental

Células - Células de placenta dejadas crecer en cultivo 3D como se describen en el documento WO2010/026575 [en adelante "células PLX"].

Modelos animales

1- Modelo inflamatorio crónico: Adyuvante de Freund - Ratas con inflamación periférica inducida por inyección intraplantar de adyuvante de Freund completo (CFA). La administración de adyuvante de Freund completo (CFA) a roedores produce un estado parecido a enfermedad que se cree que es lo más parecido al proceso de artritis reumatoide humana, que se caracteriza por inflamación de la membrana que rodea las articulaciones además de daño al hueso y al cartílago. Cuando se administra en la base de la cola, un estado poliartrítico se desarrolla en ambas patas traseras durante varios días con señales pico de inflamación, deterioro de las articulaciones e hiperalgesia que se da a aproximadamente 3 semanas después de la administración. El estado poliartrítico puede durar varias semanas (Cook y Nickerson 2005).

2- El dolor neuropático crónico de Bennett (ligado parcial del nervio ciático, modelo de lesión por opresión crónica ("CCI")) como se describe por Labuz et al. 2009 (Labuz, Schmidt et al. 2009).

Evaluación del dolor

El dolor se evaluó midiendo la hiperalgesia y antinocicepción mecánica y térmica. Los umbrales nociceptivos mecánicos se evaluaron usando el algésímetro de presión de la pata (ensayo de Randall-Selitto modificado; Ugo Basile; Brack, Rittner et al. 2004; Rittner, Labuz et al. 2006). En el día del ensayo, las ratas se dejaron sobre guata de papel, y se aplicó presión gradual por medio de pistón romo, con forma de cuña, en la superficie dorsal de la pata trasera mediante un calibrador automatizado. La presión necesaria que obtiene la retirada de la pata, el umbral de presión de la pata (PPT), se determinó mediante tres ensayos consecutivos separados por intervalos de 10 s. El mismo procedimiento se realizó en la pata contralateral; la secuencia de patas se alternó entre los sujetos para descartar efectos de orden. Los tratamientos se aleatorizaron, y el experimentador fue ciego al tratamiento. Una disminución en PPT se interpretó como hiperalgesia (dolor), mientras que un aumento en PPT se interpretó como antinocicepción (analgesia). Los umbrales nociceptivos térmicos se midieron por el ensayo de Hargreaves (Rittner, Mousa et al. 2006). Los animales se aclimataron al aparato de ensayo. Se aplicó calor radiante a la superficie plantar de una pata trasera desde debajo del suelo de cristal con una bombilla de alta intensidad, y la latencia de retirada de la pata (PWL) se midió con un temporizador electrónico (IITC Inc/Life Science, Woodland Hills, CA). La PWL fue el promedio de dos medidas tomadas con intervalos de 20 s. La intensidad del estímulo se ajustó para dar PWL de 9 a

10 s en patas no inflamadas, y el corte fue 20 s para evitar el daño del tejido. Una disminución en PWL se interpretó como hiperalgesia (dolor), mientras que un aumento en PWL se interpretó como antinocicepción (analgesia).

Resultados

1. Modelo del dolor inflamatorio (ratas)

- 5 Se empleó un modelo de dolor inflamatorio en que las ratas reciben un adyuvante de Freund completo (CFA; 150 µl) en la pata trasera derecha de forma interplantar (i.pl.; en la superficie de la pata plantar). El dolor se midió con un ensayo de presión de pata para determinar los umbrales de presión de la pata (PPT), mientras que el volumen de la pata (PV, para estimar el edema) se evaluó con un pletismómetro.

Dos días después de la aplicación de CFA las ratas se inyectaron i.pl. como sigue:

Grupo 1:	vehículo (100 µl) - 4 ratas
Grupo 2:	1 millón de células PLX en 100 µl - 4 ratas
Grupo 3:	2 millones de células PLX en 100 µl - 4 ratas

- 10 PPT y PV se midieron inmediatamente antes de la inyección de CFA, después 2 días después de CFA (y justo después las ratas recibieron células PLX) y después de forma diaria, empezando el día 1 después de la inyección de células PLX (es decir, 3 días después de CFA) hasta el 10º días después de CFA, en ambas patas traseras.

- 15 CFA inyectada i.pl. en una pata trasera disminuyó el PPT en esta pata de 2 días (2º CFA) hasta 10 días en comparación con el PPT antes de la inyección de CFA (línea base; Bas) (Fig. 8). CFA no cambió el PPT en patas contralaterales (Fig. 8). Las células PLX (2×10^6) inyectadas en patas inflamadas parecen invertir el PPT al nivel antes de la inyección de CFA (Fig. 8A). Las células PLX no cambiaron el PPT en patas contralaterales (Fig. 8B). Las células PLX no parecen alterar el edema de la pata (medido como PV) (Fig. 9A y 9B).

2. Modelo de dolor neuropático (ratones)

- 20 Dos días después de la lesión constrictiva crónica ("CCI"), los animales se trataron en el sitio de CCI (es decir, el sitio de la lesión del nervio) según los siguientes grupos:

Grupo 1:	vehículo (30 µl)	- 4 ratones
Grupo 2:	0,5 millones de células PLX en 30 µl	- 4 ratones
Grupo 3:	1 millón de células PLX en 30 µl	- 4 ratones

Las sensibilidades mecánica y térmica se evaluaron inmediatamente antes de CCI (línea base; Bas), 2 días después de CCI (2d CCI; y justo después de que los ratones recibieran las células PLX), después diariamente durante 10 días (comenzando el día 1 después de la inyección de células PLX), y después en los días 14 y 21 después de CCI, en ambas patas traseras.

- 25 CCI del nervio ciático dio por resultado la sensibilidad mecánica (definida como umbrales de retirada de la pata disminuidos) y la sensibilidad térmica (definida como latencias de retirada de la pata rebajadas) en patas enervadas por las patas lesionadas pero no en las patas contralaterales (Figs. 10 y 11). Las células PLX inyectadas en el sitio de lesión del nervio atenuaron ligeramente la sensibilidad tanto mecánica (Fig. 10A) como térmica (Fig. 11 A). Las células PLX no produjeron alteraciones en las patas contralaterales (Figs. 10B y 11B).

30 III. Nivel de péptido opiáceo endógeno en células PLX

Los niveles de péptido opiáceo en células PLX [esto es, células de la placenta dejadas crecer en cultivo 3D como se describe en el documento WO2010/026575] se examinaron en un intento de evaluar si el efecto de anti-nocicepción observado en los modelos de dolor neuropático descritos estuvo mediado por opiáceos liberados de las células PLX.

Protocolo experimental

- 35 Las células se descongelaron, se centrifugaron para eliminar la disolución de crioconservación y se suspendieron de nuevo en DMEM de glucosa baja libre de suero suplementado con bestatina 130 µM, EDTA 1 mM y Comprimidos de coctel inhibidor de proteasa Roche con núm. de cat. 04 693 124 001 a una concentración final de 10×10^9 células PLX/250 µl.

La medida de contenido opiáceo se realizó en tres muestras de 10×10^6 células de cada carga de PLX.

- 40 • 0,25 µl de una disolución madre de ionomicina 10 mM (concentración final es 10 µM) se añadieron a la suspensión celular.

- La suspensión celular se agitó durante 5 min a 600 rpm y 37°C en un bloque de calentamiento
- La suspensión celular se centrifugó (350x g/4°C) y los gránulos de células PLX y los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis.
- Las cantidades de péptido opiáceo se determinaron usando kits EIA (Phoenix Laboratories, Inc. y Peninsula Laboratories) como se detalla a continuación según las instrucciones del fabricante.

5 Kits para la detección de péptidos opiáceos:
 Encefalina-metionina - Kit RIA (Peninsula Laboratories; núm. S-2119) Encefalina-Leucina- Kit EIA fluorescente (Phoenix Laboratories Inc.; núm. FEK-024-21)

Dinorfina A - Kit EIA fluorescente (Phoenix; núm. FEK-021-03)
 10 Endorfina, beta - kit EIA fluorescente (Phoenix; núm. FEK-022-14)

Resultados

Las células PLX contienen beta-endorfina, dinorfina A, elu-encefalina y met-encefalina a diferentes niveles. El nivel de cada uno de estos opiáceos se determinó usando los kits EIA fluorescentes según el protocolo del fabricante (Phoenix Laboratories Inc.). Se examinaron 10^7 células de cada carga. Los niveles de estos opiáceos en 9 cargas de PLX diferentes se presentan en las Figuras 12A-E.

15 Ejemplo de referencia IV. Terapia celular para la regeneración del miocardio en corazones sin carga: un modelo experimental de terapia con dispositivo asistido mecánico

El fallo cardíaco (HF) afecta a una población de pacientes que crece rápidamente. A pesar de mejoras en el entendimiento y terapia de muchas etapas de enfermedad cardiovascular, ha habido poco progreso en el tratamiento de HF. En el fallo cardíaco en etapa final, los dispositivos de asistencia ventricular mecánica (VAD) se están usando como puente al trasplante, como un puente a la recuperación, o como la terapia definitiva. El efecto terapéutico de la población de células descrito en esta memoria en el aumento de la eficacia del soporte VAD se ensaya en un modelo animal de infarto de miocardio (MI). El modelo normal para MI agudo es el ratón, por ligado de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) (Kolk, Meyberg et al. 2009), que proporciona una herramienta útil y conveniente para la investigación en la enfermedad coronaria isquémica.

Protocolo experimental

Modelo de enfermedad - infarto de miocardio por ligado de LAD

Cepa animal - Balb/C, macho. 6-8 semanas

Número total de ratones - 15

30 Distribución de ratones entre diferentes grupos experimentales

Grupo experimental temprano (día 3) (PLX) - 3

Grupo experimental tardío (día 28) (PLX) - 6

Grupo de control tardío (día 28) (infarto, solo vehículo) - 6

Dosis de células/ratones - 1×10^6

35 Células/vial - 1×10^6

Anestesia usada - Quetamina-xilaxina

Procedimientos experimentales

Día 0 - ligado LAD e inyección de células en 100-150 μ l de PBS (sin Ca, Mg)

Día 1 - 1^{er} ecocardiografía (los 3 grupos),

40 Día 3 - sacrificio de 3 ratones del grupo temprano (PLX) y someterlos a disección buscando el antígeno nuclear humano (hNuc).

Día 7 - 2^a ecocardiografía (ambos grupos tardíos)

Día 14 - 3^a ecocardiografía (ambos grupos tardíos)

Día 21 - 4ª ecocardiografía (ambos grupos tardíos)

Día 28 - 5ª ecocardiografía (ambos grupos tardíos), MRI (ambos grupos tardíos).

Los ratones se sacrificarán al final de las cuatro semanas seguido por la escisión de los corazones. Algunos de los corazones se usarían para aislamiento de ARN y otros se someterán a disección en parafina para la evaluación de estructuras finas y criodisección para la detección de marcadores específicos cardíacos.

Perfil marcador para inmunohistoquímica:

1. Antígeno nuclear humano (hNuc) - en la etapa temprana (día 3).
2. Cadena pesada de miosina cardíaca

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

Además, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se va a construir como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en que se usan los encabezados de sección, no se construirían como limitantes necesariamente.

Lista de referencia

(otras referencias se citan en la solicitud)

Ajmo C.T., Jr., Vernon D.O., Collier L., Hall A.A., Garbuzova-Davis S., Willing A. y Pennypacker K.R., The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration, *J, Neurosci. Res.* 86 (2008) 2227-2234.

Arcila, M. E., B. T. Ameredes, et al. (1997). "Mass and functional capacity of regenerating muscle is enhanced by myoblast transfer." *J Neurobiol* 33(2): 185-98.

Bach, A. D., J. P. Beier, et al. (2004). "Skeletal muscle tissue engineering." *J Cell Mol Med* 8(4): 413-22.

Bliss T., Guzman R., Daadi M. y Steinberg G.K., Cell transplantation therapy for stroke, *Stroke* 38 (2007) 817-826.

Brack, A., H. L. Rittner, et al. (2004). "Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells." *Pain* 112(3): 229-38.

Chang C.J., Yen M.L., Chen Y.C., Chien C.C., Huang H.I., Bai C.H. y Yen B.L., Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma, *Stem Cells* 24 (2006) 2466-2477.

Chen J., Li Y., Katakowski M., Chen X., Wang L., Lu D., Lu M., Gautam S.C. y Chopp M., Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat, *J. Neurosci. Res.* 73 (2003) 778-786.

Chen J., Sanberg P.R., Li Y., Wang L., Lu M., Willing A.E., Sanchez-Ramos J y Chopp M., Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats, *Stroke* 32 (2001) 2682-2688.

Chopp M. y Li Y., Treatment of neural injury with marrow stromal cells, *Lancet Neurol.* 1 (2002) 92-100.

Cook, C. D. y M. D. Nickerson (2005). "Nociceptive sensitivity and opioid antinociception and antihyperalgesia in Freund's adjuvant-induced arthritic male and female rats." *J Pharmacol Exp Ther* 313(1): 449-59.

Deasy, B. M., Y. Li, et al. (2004). "Tissue engineering with muscle-derived stem cells." *Curar Opin Biotechnol* 15(5): 419-23.

DeRosimo, J. F., C. H. Washabaugh, et al. (2000). "Enhancement of adult muscle regeneration by primary myoblast transplantation." *Cell Transplant* 9(3): 369-77.

Don Y. y Benveniste E.N., Immune function of astrocytes, *Glia* 36 (2001) 180-190.

Dworkin, R. H., M. Backonja, et al. (2003). "Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations." *Arch Neurol* 60(11): 1524-34.

Faulkner J.R., Herrmann J.E., Woo M.J., Tansey K.E., Doan N.B. y Sofroniew M.V., Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury, *J. Neurosci.* 24 (2004) 2143-2155.

- Fish, J. S., N. H. McKee, et al. (1989). "Isometric contractile function recovery following tourniquet ischemia." *J Surg Res* 47(4): 365-70.
- 5 Gao Q" Li Y. y Chopp M., Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult, *Neuroscience* 136 (2005) 123-134.
- Himeda T., Tounai H., Hayakawa N. y Araki T., Postischemic alterations of BDNF, NGF, HSP 70 and ubiquitin immunoreactivity in the gerbil hippocampus: pharmacological approach, *Cell Mol. Neurobiol.* 27 (2007) 229-250.
- 10 Hu J., Ferreira A y Van Eldik L.J., S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes, *J. Neurochem.* 69 (1997) 2294-2301.
- Huard, J., B. Cao, et al. (2003). "Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration." *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(3): 230-7.
- 15 Hum P.D., Subramanian S., Parker S.M., Afentoulis M.E., Kaler L.J., Vandenberg A.A. y Offner H., T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation, *J. Cereb. Blood Flow Metab* 27 (2007) 1798-1805.
- In 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der K.C., de Groot-Swings G.M., Claas F.H., Fibbe W.E, y Kanhai H.H., Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta, *Stem Cells* 22 (2004) 1338-1345.
- 20 Irintchev, A., M. Langer, et al. (1997). "Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts." *J Physiol* 500 (Pt 3): 775-85.
- Jones B.J., Brooke G., Atkinson K. y McTaggart S.J., Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells, *Placenta* 28 (2007) 1174-1181.
- Kamelger, F. S., R. Marksteiner, et al. (2004). "A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model." *Biomaterials* 25(9): 1649-55.
- 25 Kolk, M. V., D. Meyberg, et al. (2009). "LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction." *J Vis Exp*(32).
- Kundrotiene J., Wagner A. y Liljequist S., Extradural compression of sensorimotor cortex: a useful model for studies on ischemic brain damage and neuroprotection, *J. Neurotrauma* 19 (2002) 69-84.
- Labuz, D., Y. Schmidt, et al. (2009). "Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice." *J Clin Invest* 119(2): 278-86.
- 30 Le Blank K., Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells, *Cytotherapy.* 5 (2003) 485-489.
- Lee M.Y., Deller T., Kirsch M., Frotscher M. y Hofmann H.D., Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion, *J. Neurosci.* 17(1997) 1137-1146.
- 35 Li, Y. y J. Huard (2002). "Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle." *Am J Pathol* 161(3): 895-907.
- Li Y., Chen J., Chen X.G., Wang L., Gautam S.C., Xu Y.X., Katakowski M., Zhang LJ., Lu M., Janakiraman N. y Chopp M., Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery, *Neurology* 59 (2002) 514-523.
- 40 Liberto CM., Albrecht P.J., Herx L.M., Yong V.W. y Levison S.W., Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes, *J, Neurochem.* 89 (2004) 1092-1100.
- Marti H.H. y Risau W., Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95 (1998) 15809-15814.
- Matziolis, G., T. Winkler, et al. (2006). "Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats." *Tissue Eng* 12(2): 361-7.
- 45 Nishishita T., Ouchi K., Zhang X., Inoue M., Inazawa T., Yoshiura K., Kuwabara K., Nakaoka T., Watanabe N., Igura K., Takahashi TA. y Yamashita N., A potential pro-angiogenic cell therapy with human placenta-derived mesenchymal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (2004) 24-31.
- Okawa H., Okuda O., Arai H., Sakuragawa N. y Sato K., Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain, *Neuroreport* 12 (2001) 4003-4007.

- Peng, H. y J. Huard (2004). "Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair." *Transpl Immunol* 12(3-4): 311-9.
- 5 Prather W.R., Toren A. y Meiron M., Placental-derived and expanded mesenchymal stromal cells (PLX-I) to enhance the engraftment of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 8 (2008) 1241-1250.
- Prather W.R., Toren A., Meiron M., Ofir R., Tschöpe C. y Horwitz E.M., The role of placental-derived adherent stromal cell (PLX-PAD) in die treatment of critical limb ischemia, *Cytotherapy.* 11(4) (2009) 427-434.
- Racz, J. B., G. Illyes, et al. (1997). "The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle." *Eur Surg Res* 29(4): 254-63.
- 10 Rittner, H. L., A. Brack, et al. (2008). "Pain and the immune system." *Br J Anaesth* 101(1): 40-4.
- Rittner, H. L., D. Labuz, et al. (2006). "Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells." *FASEBJ* 20(14): 2627-9.
- Rittner, H. L., S. A. Mousa, et al. (2006). "Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain." *J Leukoc Biol* 79(5): 1022-32.
- 15 Roelen D.L., van der Mast B.J., in't Anker P.S., Kleijburg C, Eikmans M., van B.E., de Groot-Swings G.M., Fibbe W.E., Kanhai H.H., Scherjon S.A. y Claas F.H., Differential immunomodulatory effects of fetal versus maternal multipotent stromal cells, *Hum. Immunol.* 70 (2009) 16-23.
- Saxena, A. K., J. Marler, et al. (1999). "Skeletal muscle tissue engineering using isolated myoblasts on synthetic biodegradable polymers: preliminary studies." *Tissue Eng* 5(6): 525-32
- 20 Schabitz W.R., Berger C, Kollmar R., Seitz M., Tanay E., Kiessling M., Schwab S. y Sommer C., Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia, *Stroke* 35 (2004) 992-997.
- Shen L.H., Li Y., Chen J., Zacharek A., Gao Q., Kapke A., Lu M., Raginski K., Vanguri P., Smith A. y Chopp M., Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke, *J. Cereb. Blood Flow Metab* 27 (2007) 6-13.
- 25 Silver J. y Miller J.H., Regeneration beyond the glial scar, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004) 146-156.
- Strachan R.D., Kane P.J., Cook S., Chambers I.R., Clayton C.B. y Mendelow A.D., Immunosuppression by whole-body irradiation and its effect on oedema in experimental cerebral ischaemia, *Acta Neurol. Scand.* 86 (1992) 256-259.
- 30 Tamura A., Graham D.I., McCulloch J. y Teasdale G.M., Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion, *J. Cereb. Blood Flow Metab* 1 (1981) 53-60.
- Toyama K., Honmou O., Harada K" Suzuki J., Houkin K., Hamada H. y Kocsis J.D., Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia, *Exp. Neurol.* 216 (2009) 47-55.
- 35 Trendelenburg G. y Dirnagl U., Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning, *Glia* 50 (2005) 307-320.
- Wei O.Y., Huang Y.L., Da CD. y Cheng J.S., Alteration of basic fibroblast growth factor expression in rat during cerebral ischemia, *Acta Pharmacol. Sin.* 21 (2000) 296-300.
- 40 Yen B.L., Huang Hi., Chien C.C., Jui H.Y., Ko B.S, Yao M., Shun C.T., Yen M.L., Lee MX. y Chen Y.C., Isolation of multipotent cells from human term placenta, *Stem Cells* 23 (2005) 3-9.
- Zhao M.Z., Nonoguchi N., Ikeda N., Watanabe T., Furutama D., Miyazawa D., Funakoshi H., Kajimoto Y., Nakamura T., Dezawa M., Shibata M.A., Otsuki Y., Coffin R.S., Liu W.D., Kuroiwa T. y Miyatake S., Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector, *J. Cereb. Blood Flow Metab* 26 (2006) 1176-1188.
- 45 Zhu H., Mitsuhashi N., Klein A., Barsky L.W., Weinberg K., Barr M.L., Demetriou A. y Wu G.D., The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix, *Stem Cells* 24 (2006) 928-935.

También se describen los siguientes puntos:

1. Una población de células adherentes derivadas de la placenta, en donde la población comprende al menos 70% de células adherentes de una parte materna de la placenta.
- 5 2. La población de células adherentes del punto 1, en donde dicha parte materna de la placenta comprende decidua basal, decidua parietal o tanto decidua basal como decidua parietal.
3. Una población de células adherentes de la placenta, en donde la población comprende al menos 70% de células adherentes de una parte fetal de la placenta.
4. La población de células del punto 3, en donde dicha parte fetal de la placenta comprende amnios.
5. La población de células del punto 3, en donde dicha parte fetal de la placenta consiste en amnios.
- 10 6. La población de células del punto 3, en donde dicha parte fetal de la placenta comprende vellosidades coriónicas.
7. La población de células del punto 3, en donde dicha parte fetal de la placenta consiste en vellosidades coriónicas.
8. La población de células del punto 1 o 2, en donde no más del 3,5%, no más del 3%, no más del 2% o no más del 1% de la población de células adherentes de una parte materna expresan CD200 como se mide por citometría de flujo usando un control de isotipo para definir la expresión negativa.
- 15 9. Un medio acondicionado aislado de un cultivo que comprende cualquiera de las poblaciones de células de los puntos 1-8.
10. Una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo la población de células del punto 1, 2 u 8 o el medio acondicionado del punto 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 11. Un método para tratar un proceso médico que puede aprovechar el trasplante de célula u órgano que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica del punto 10, tratando así al sujeto.
12. El uso de la población de células del punto 1 o el medio acondicionado del punto 9, para la fabricación de un medicamento para tratar un proceso que puede aprovechar el trasplante de célula u órgano.
- 25 13. El método del punto 11 o el uso del punto 12, en donde el proceso se selecciona del grupo que consiste en isquemia, enfermedad arterial periférica (PAD), isquemia crítica de la extremidad (CLI), isquemia de la extremidad inferior, ictus, enfermedad vascular isquémica, enfermedad vascular del riñón, enfermedad cardíaca isquémica, isquemia de miocardio, enfermedad arterial coronaria (CAD), enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad de la arteria coronaria principal izquierda, enfermedad oclusiva arterial, isquemia periférica, enfermedad vascular periférica, arteriosclerosis, retinopatía, reparación de retina, trastorno de remodelación, síndrome de von Hippel-Lindau, enfermedad vascular telangiectasiásquémica hemorrágica hereditaria, enfermedad de Buerger, 30 enfermedad renal isquémica, placenta isquémica, trastornos asociados con la reproducción, enfermedad de huésped frente a injerto, trasplante de órgano sólido, trasplante de células madre hematopoyéticas, diabetes, daño en tejido conectivo, cáncer, pre-cáncer, cáncer de hueso, osteosarcoma, metástasis ósea, fractura ósea, herida por quemado, defecto de cartílago articular, herida profunda, curado de herida retrasado, curado de úlcera retrasado, quiste óseo subcondral, osteoporosis, osteoartritis, hueso degenerado, daño en cartílago, defecto de cartílago articular, tendones lesionados, enfermedades autoinmunes, trastornos metabólicos, psoriasis, dolor neuropático, lesión del nervio periférico, enfermedad neurodegenerativa, soporte de trasplante de riñón y enfermedades inflamatorias.
- 35 14. El método del punto 11 o el uso del punto 12, en donde el proceso es fallo cardíaco, infarto de miocardio, dolor neuropático, defecto del músculo esquelético, ictus o enfermedad cardíaca isquémica.
- 40 15. La población de células del punto 1, 2 u 8, la composición farmacéutica del punto 10, el método del punto 11, o el uso del punto 12, en donde dichas células adherentes expresan uno o más de CD73, CD90, CD29, CD105 o D7-fib.
- 45 16. La población de células del punto 1, 2, u 8, la composición farmacéutica del punto 10, el método del punto 11, o el uso del punto 12, en donde dichas células adherentes no expresan CD3, CD4, CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD31, CD200, KDR, o CD79.
17. La población de células del punto 1, 2 u 8, la composición farmacéutica del punto 10, el método del punto 11, o el uso del punto 12, en donde dichas células adherentes suprimen una reacción inmune a un menor grado que las células adherentes de una parte fetal de placenta cuando se ensayan en un cultivo de linfocitos mixto.
- 50 18. La población de células del punto 1, 2 u 8, la composición farmacéutica del punto 10, el método del punto 11, o el uso del punto 12, en donde dichas células adherentes se cultivan en un cultivo tridimensional (3D).

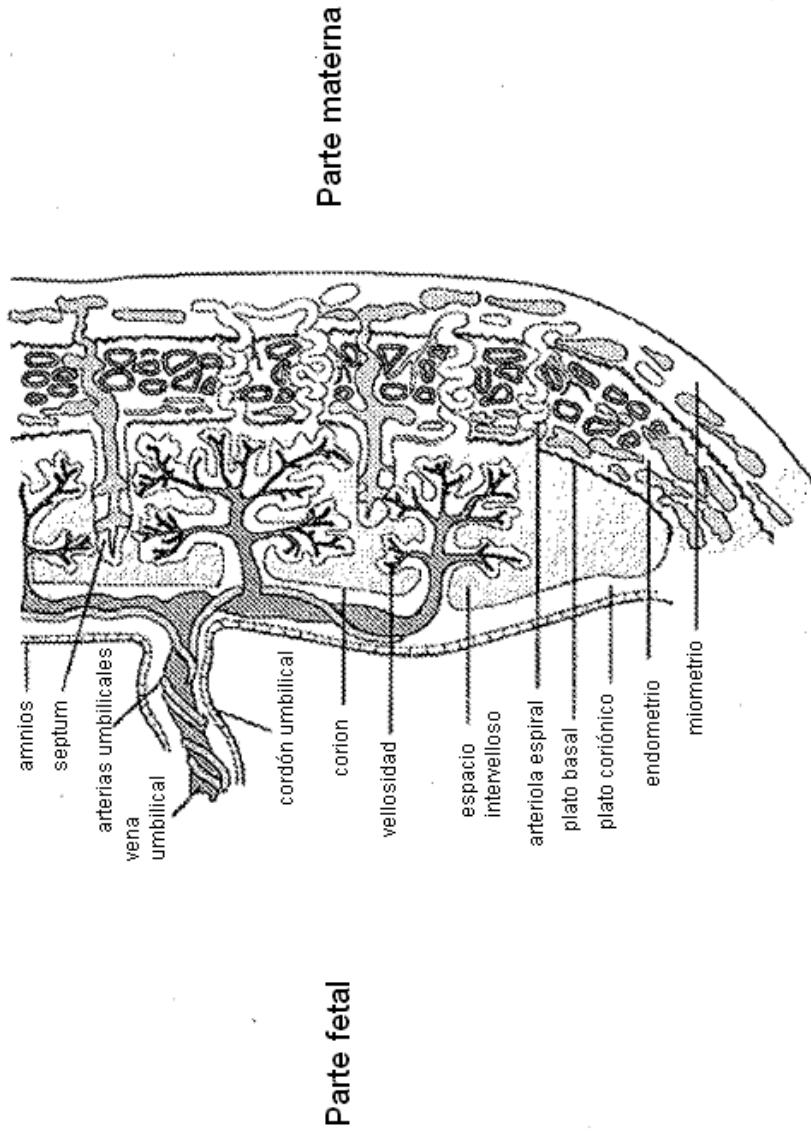
19. La población de células, composición farmacéutica, método, o uso del punto 18, en donde dicho cultivo tridimensional (3D) comprende un biorreactor 3D.
20. La población de células, composición farmacéutica, método o uso del punto 18, en donde el cultivo de dichas células adherentes en dicho cultivo 3D se efectúa bajo perfusión.
- 5 21. La población de células, composición farmacéutica, método o uso del punto 18, en donde el cultivo de dichas células adherentes se efectúa durante al menos 3 días.
22. La población de células, composición farmacéutica, método o uso del punto 18, en donde el cultivo de dichas células adherentes se efectúa hasta que al menos el 10% de dichas células adherentes están proliferando.
- 10 23. La población de células del punto 1, 2 u 8, la composición farmacéutica del punto 10, el método del punto 11, o el uso del punto 12, en donde dichas células adherentes se cultivan en un cultivo bidimensional (2D).
24. La población de células, la composición farmacéutica, el método o el uso del punto 23, en donde al menos el 10% de dichas células adherentes están proliferando.
- 15 25. La población de células del punto 1, 2 u 8, la composición farmacéutica del punto 10, el método del punto 11 o el uso del punto 12, en donde dichas células adherentes están menos comprometidas con una línea osteogénica en comparación con las células adherentes de médula ósea dejadas crecer y dejadas diferenciarse bajo las mismas condiciones.
- 20 26. La población de células del punto 1, 2 u 8, la composición farmacéutica del punto 10, el método del punto 11 o el uso del punto 12, en donde dichas células adherentes están menos comprometidas con una línea adipogénica en comparación con las células adherentes de médula ósea dejadas crecer y diferenciarse bajo las mismas condiciones.
27. La población de células del punto 1, 2 u 8, la composición farmacéutica del punto 10, el método del punto 11 o el uso del punto 12, en donde dichas células adherentes comprenden un diámetro celular que es menor que el de las células adherentes derivadas de una parte fetal de placenta.
- 25 28. La población de células del punto 1, 2 u 8, la composición farmacéutica del punto 10, el método del punto 11 o el uso del punto 12, en donde dichas células adherentes comprenden una capacidad de proliferación celular que es mayor que el de las células adherentes derivadas de una parte fetal de placenta.
29. Un método para tratar un defecto del músculo esquelético que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de composición que comprende células estromales adherentes derivadas de placenta, tratando así el defecto del músculo esquelético.
- 30 30. Un método para tratar dolor neuropático que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de composición que comprende células estromales adherentes derivadas de placenta, tratando así el dolor neuropático.
- 35 31. El método del punto 30, en donde el dolor neuropático se asocia con dolor inflamatorio, polineuropatía diabética, neuropatía sensorial por virus de inmunodeficiencia humano (VIH), síndromes post-ictus, isquemia o esclerosis múltiple.
32. Un método para tratar el infarto de miocardio que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de composición que comprende células estromales adherentes derivadas de placenta, tratando así el infarto de miocardio.
- 40 33. El uso de una composición que comprende células estromales adherentes derivadas de placenta para la fabricación de un medicamento para tratar un defecto de músculo esquelético, dolor neuropático, infarto de miocardio.
34. Una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo células estromales adherentes derivadas de placenta para el uso en el tratamiento de un defecto de músculo esquelético, dolor neuropático o infarto de miocardio.
- 45 35. La composición farmacéutica del punto 34, en donde el dolor neuropático se asocia con dolor inflamatorio, polineuropatía diabética, neuropatía sensorial por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), síndromes post-ictus, isquemia o esclerosis múltiple.
36. El método de cualquiera de los puntos 29-32, el uso del punto 33, o la composición farmacéutica del punto 34 o 35, en donde dichas células adherentes expresan uno o más de CD73, CD90, CD29, CD105 o D7-fib.

37. El método de cualquiera de los puntos 29-32, el uso del punto 33, o la composición farmacéutica del punto 34 o 35, en donde dichas células adherentes no expresan CD3, CD4, CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD31, CD200, CD271, KDR o CD79.
- 5 38. El método de cualquiera de los puntos 29-32, el uso del punto 33, o la composición farmacéutica del punto 34 o 35, en donde dichas células adherentes expresan uno o más de beta-endorfina, dinorfina A, leu-encefalina o met-enkefalina.
39. El método de cualquiera de los puntos 29-32, el uso del punto 33, o la composición farmacéutica del punto 34 o 35, en donde dichas células adherentes suprimen la actividad de la célula T.
- 10 40. El método de cualquiera de los puntos 29-32, el uso del punto 33, o la composición farmacéutica del punto 34 o 35, en donde dichas células adherentes comprenden al menos el 70% de células adherentes de una parte materna de la placenta.
41. El método, uso o composición farmacéutica del punto 40, en donde no más del 3,5%, no más del 3%, no más del 2%, o no más del 1% de las células adherentes de una parte materna expresan CD200 como se mide por citometría de flujo usando un control de isotipo para definir la expresión negativa.
- 15 42. El método, uso o composición farmacéutica del punto 40, en donde dicha parte materna de la placenta comprende decidua basal, decidua parietal o tanto decidua basal como decidua parietal.
43. El método de cualquiera de los puntos 29-32, el uso del punto 33 o la composición farmacéutica del punto 34 o 35, en donde dichas células adherentes se producen por cultivo usando condiciones de cultivo 3D.
- 20 44. El método, uso o composición farmacéutica, del punto 43, en donde dicho cultivo tridimensional (3D) comprende un biorreactor 3D.
45. El método, uso o composición farmacéutica, del punto 43, en donde el cultivo de dichas células adherentes en dicho cultivo 3D se efectúa bajo perfusión.
46. El método, uso o composición farmacéutica del punto 43, en donde el cultivo de dichas células adherentes se efectúa durante al menos 3 días.
- 25 47. El método, uso o composición farmacéutica del punto 43, en donde el cultivo de dichas células adherentes se efectúa hasta que al menos el 10% de dichas células adherentes están proliferando.

REIVINDICACIONES

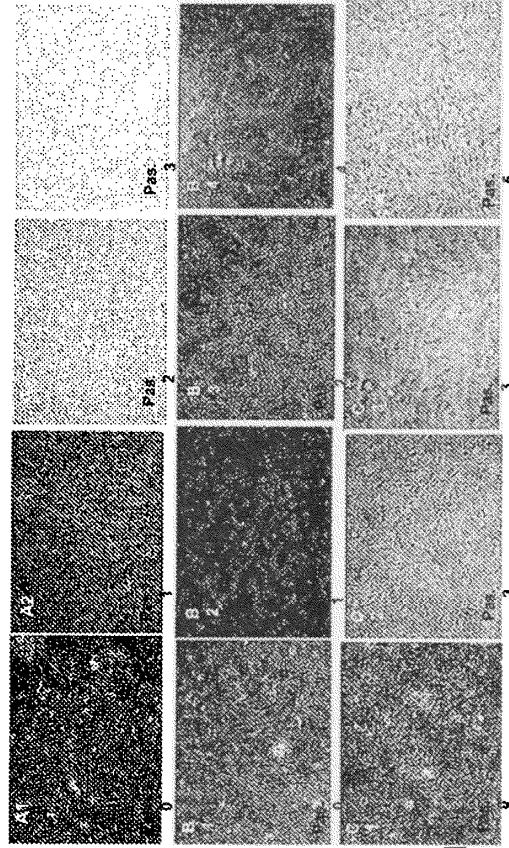
1. Una población de células adherentes derivadas de la placenta para el uso en el tratamiento de un defecto del músculo esquelético.
- 5 2. La población de células adherentes para el uso según la reivindicación 1, en donde la población de células adherentes comprende al menos el 70% de células adherentes de una parte materna de la placenta.
3. La población de células adherentes para el uso según la reivindicación 2, en donde la parte materna de la placenta comprende decidua basal, decidua parietal o tanto decidua basal como decidua parietal.
- 10 4. La población de células adherentes para el uso según la reivindicación 2 o 3, en donde no más del 3,5%, no más del 3%, no más del 2%, o no más del 1% de la población de células adherentes expresan CD200 como se mide por citometría de flujo usando un control de isotipo para definir la expresión negativa.
5. La población de células adherentes para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichas células adherentes expresan uno o más de CD73, CD90, CD29, CD105 o D7-fib.
- 15 6. La población de células adherentes para el uso según la reivindicación 5, en donde dichas células adherentes expresan todo de CD73, CD90, CD29 y CD105.
7. La población de células adherentes para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dichas células adherentes no expresan CD3, CD4, CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD 19, CD34, CD31, CD200, KDR o CD79.
- 20 8. La población de células adherentes para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichas células adherentes muestran un diámetro celular que es menor que el de las células adherentes derivadas de una parte fetal de la placenta.
9. La población de células adherentes para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dichas células adherentes comprenden una capacidad de proliferación celular que es mayor que la de las células adherentes derivadas de una parte fetal de la placenta.
- 25 10. La población de células adherentes para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dichas células adherentes expresan uno o más de beta-endorfina, dinorfina A, leu-encefalina o met-encefalina.
11. La población de células adherentes para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dichas células adherentes se han cultivado en un cultivo tridimensional (3D).
12. La población de células adherentes para el uso según la reivindicación 11, en donde dicho cultivo tridimensional (3D) comprende un biorreactor 3D.

30



Copyright ©2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc.
Todos los derechos reservados

Fig. 1



Figs. 2A-C

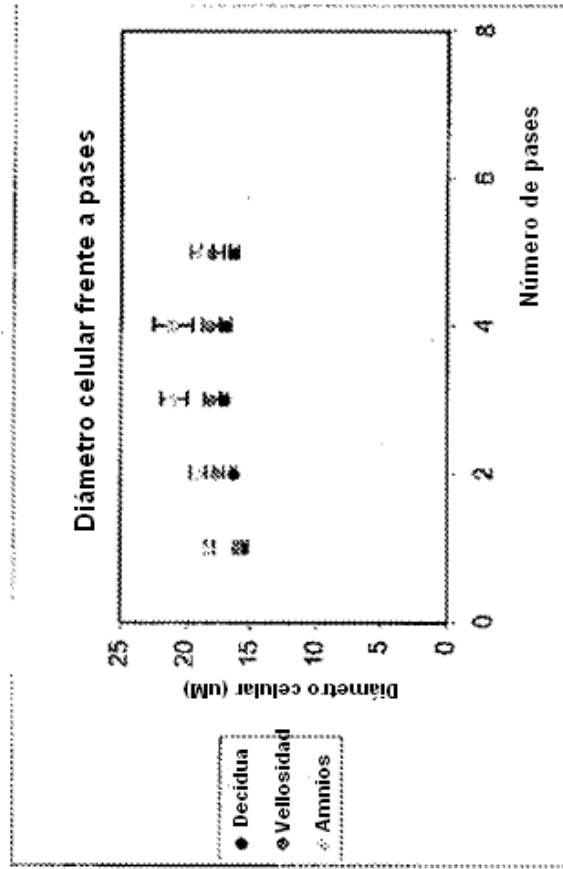


Fig. 3

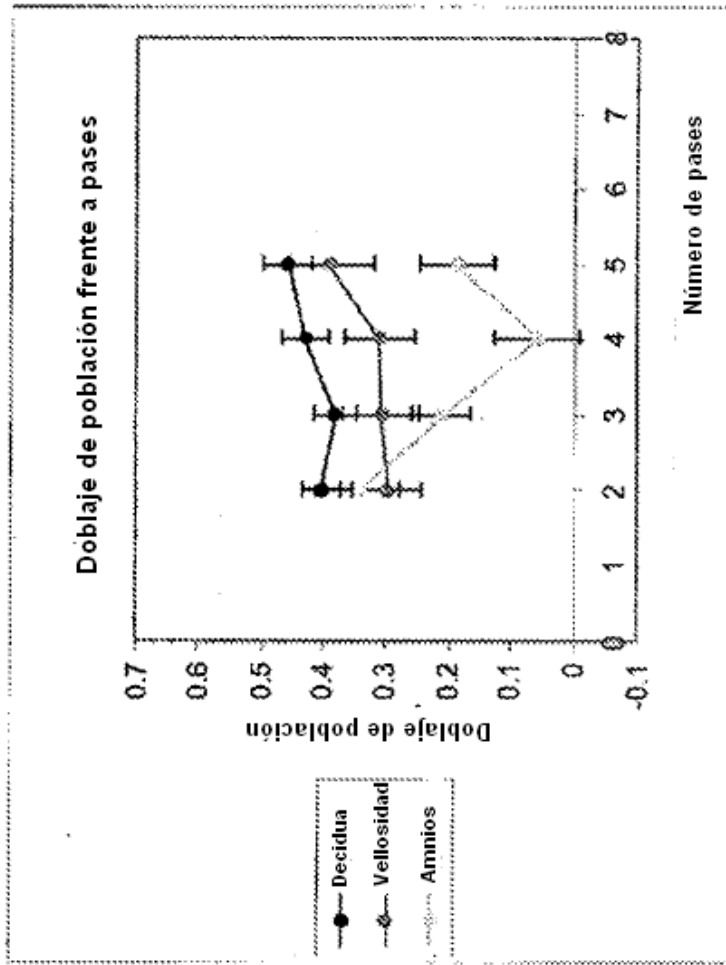


Fig. 4

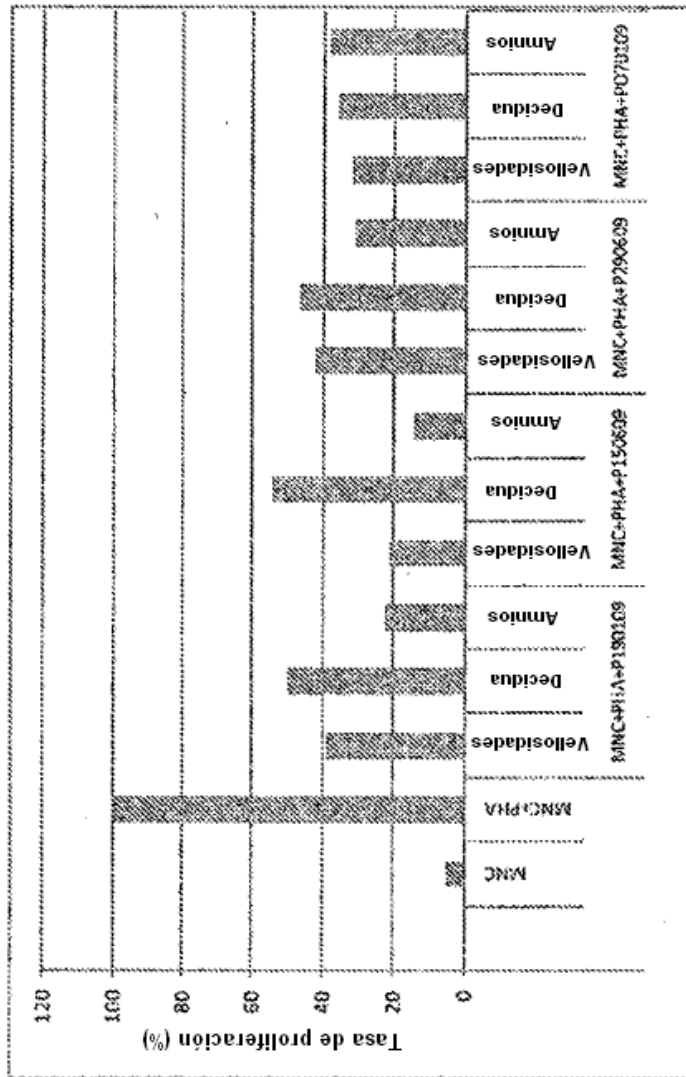


Fig. 5A

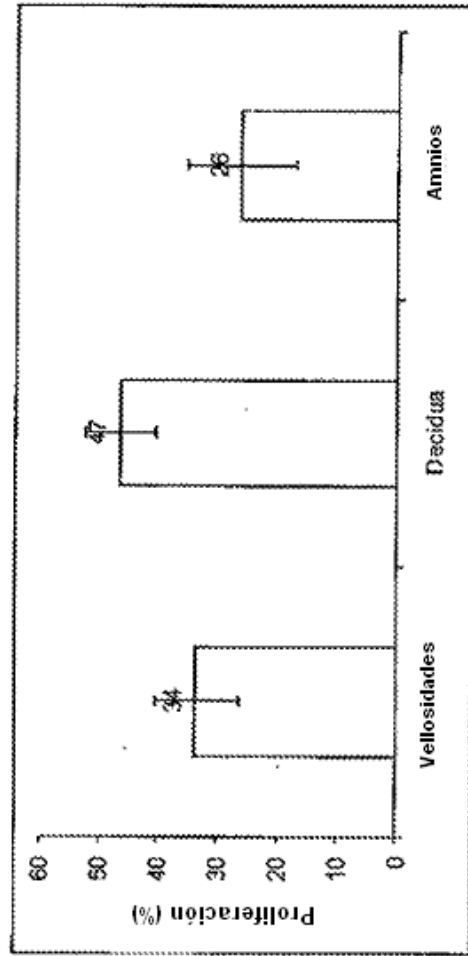
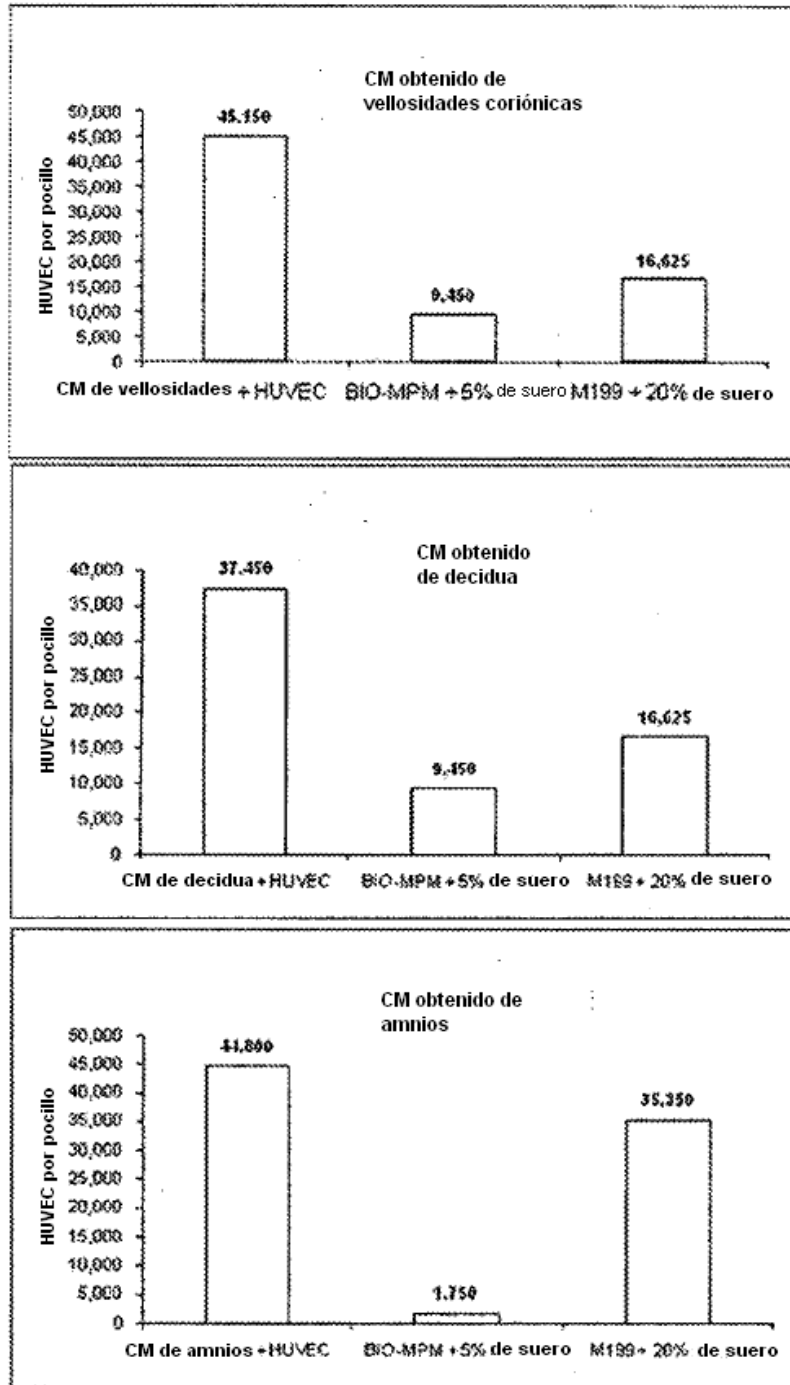


Fig. 5B



Figs. 6A-C

Fig. 7

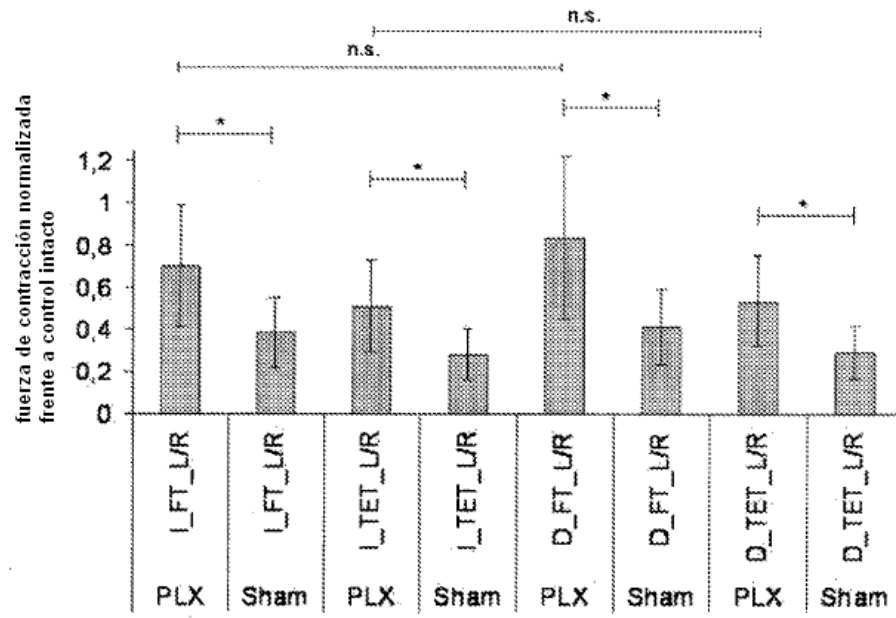


Fig. 8A

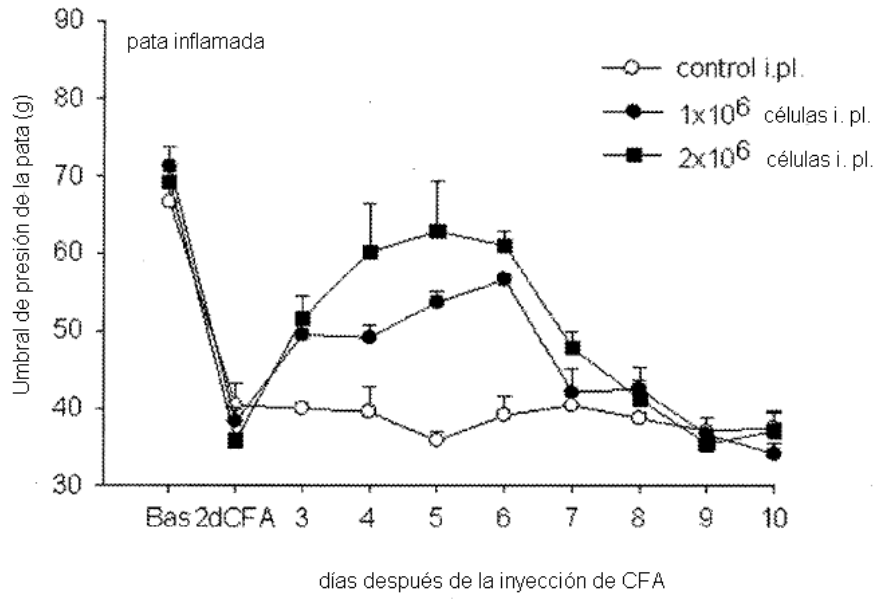


Fig. 8B

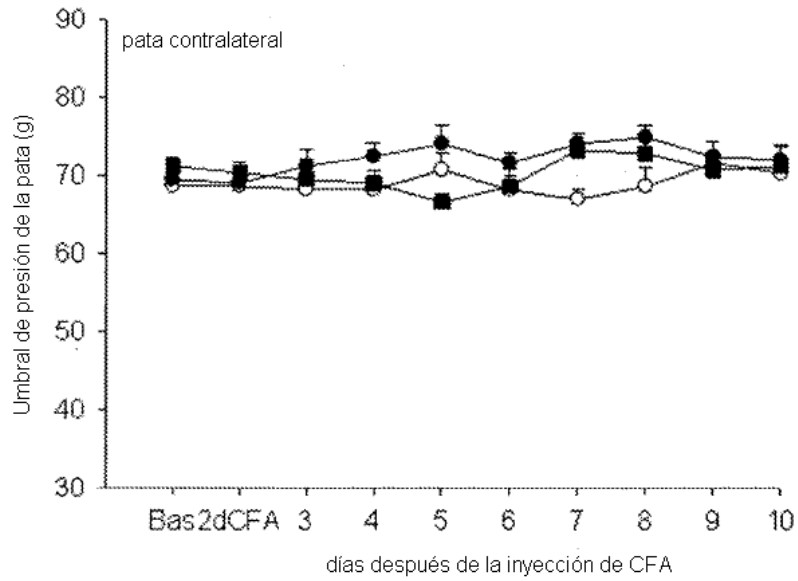


Fig. 9A

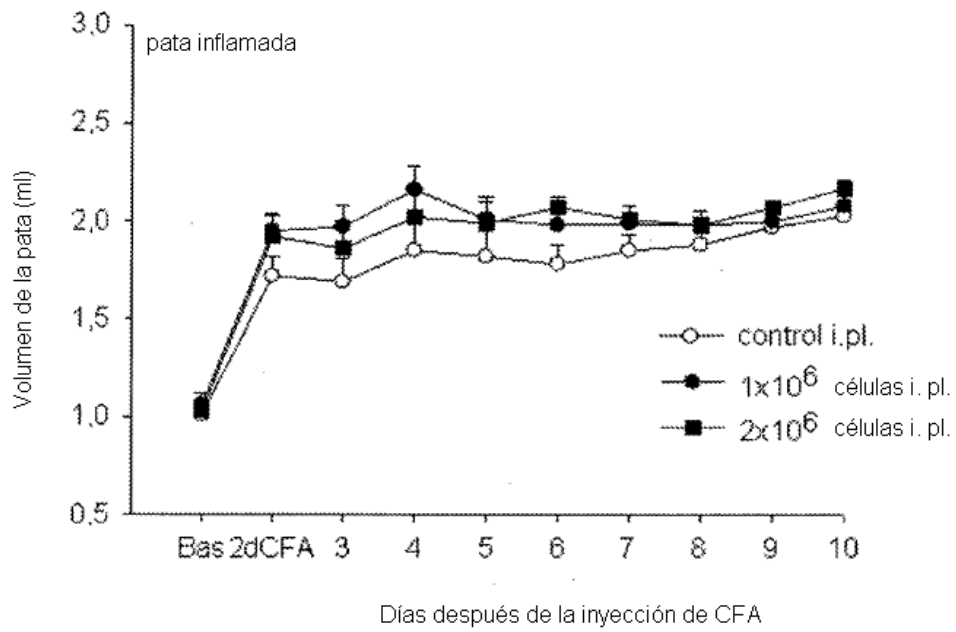


Fig. 9B

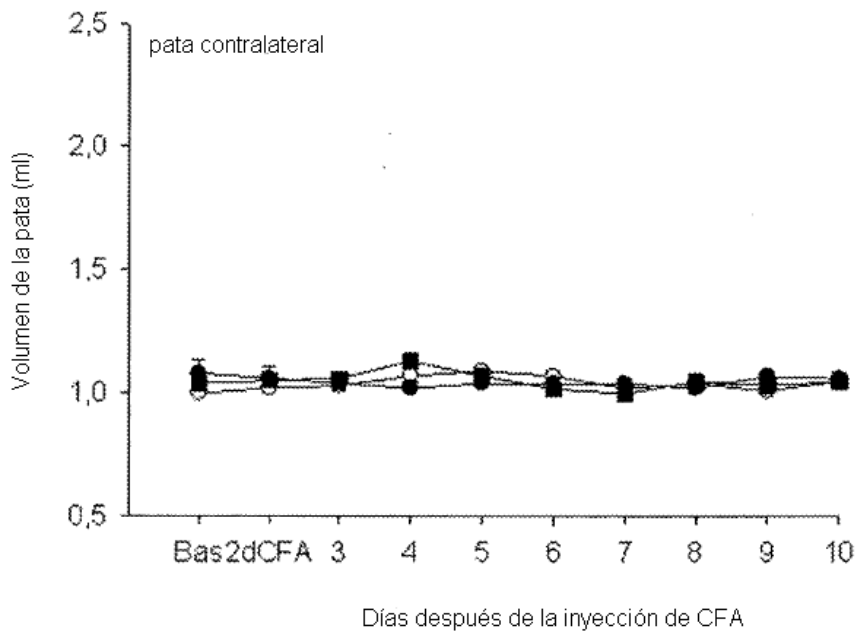


Fig. 10A

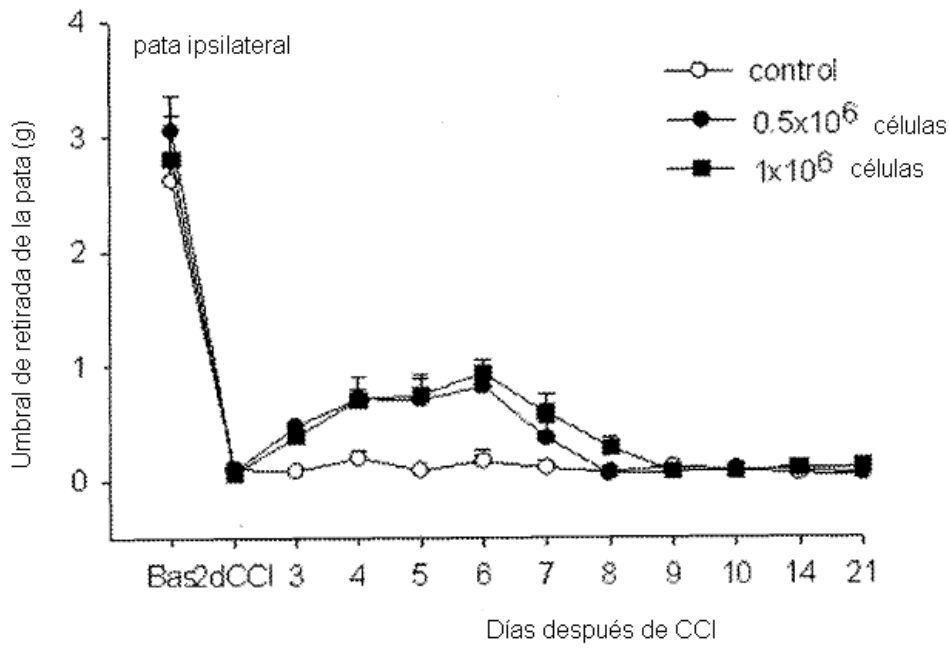


Fig. 10B

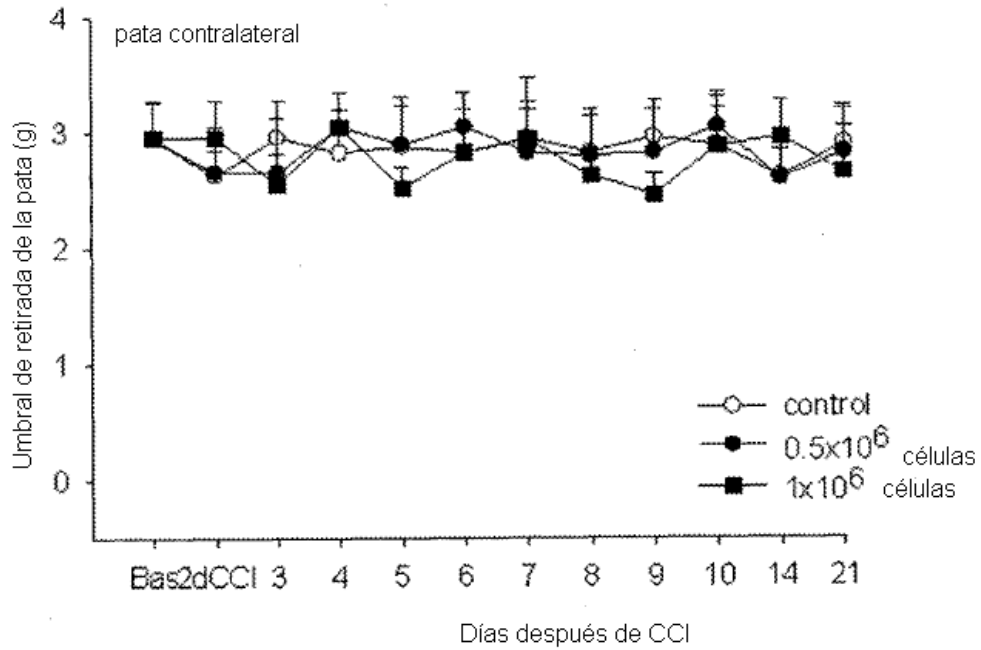


Fig. 11A

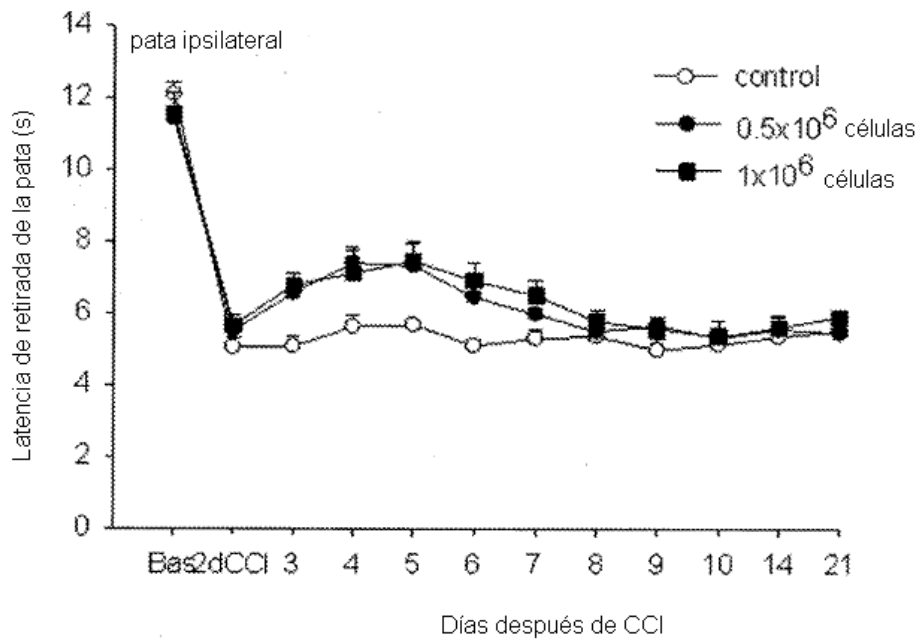


Fig. 11B

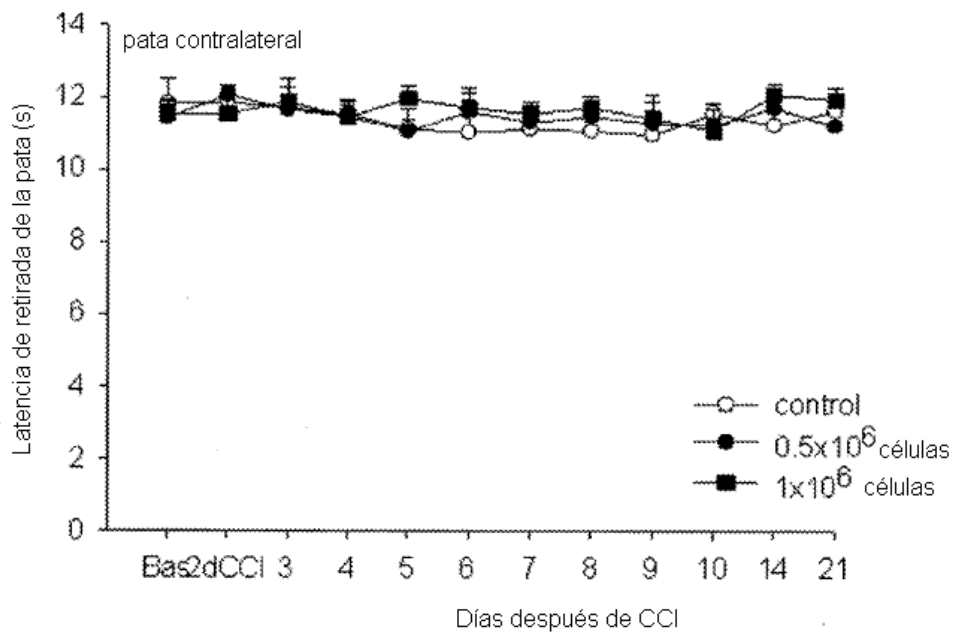


Fig. 12A

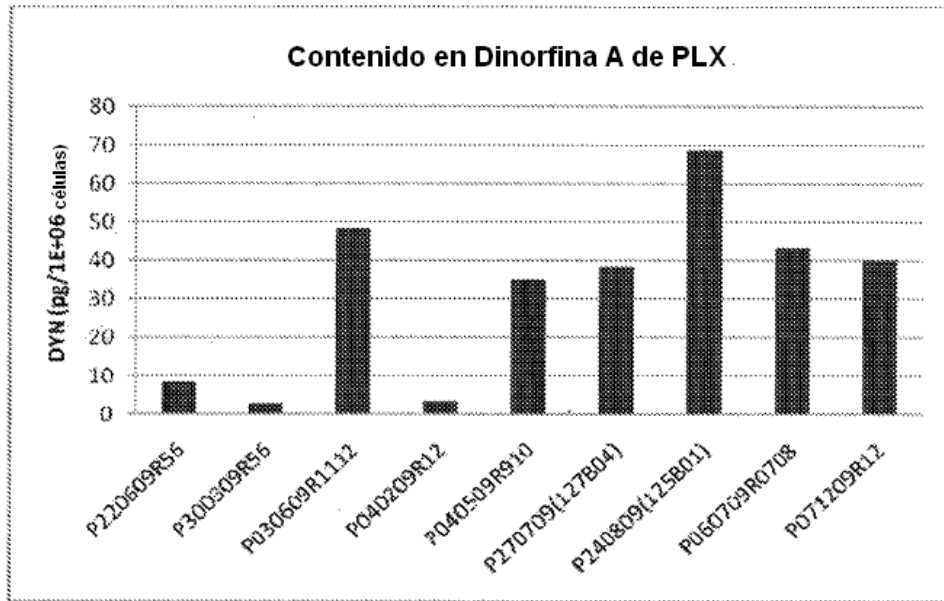


Fig. 12B

Contenido en Dinorfina A de PLX

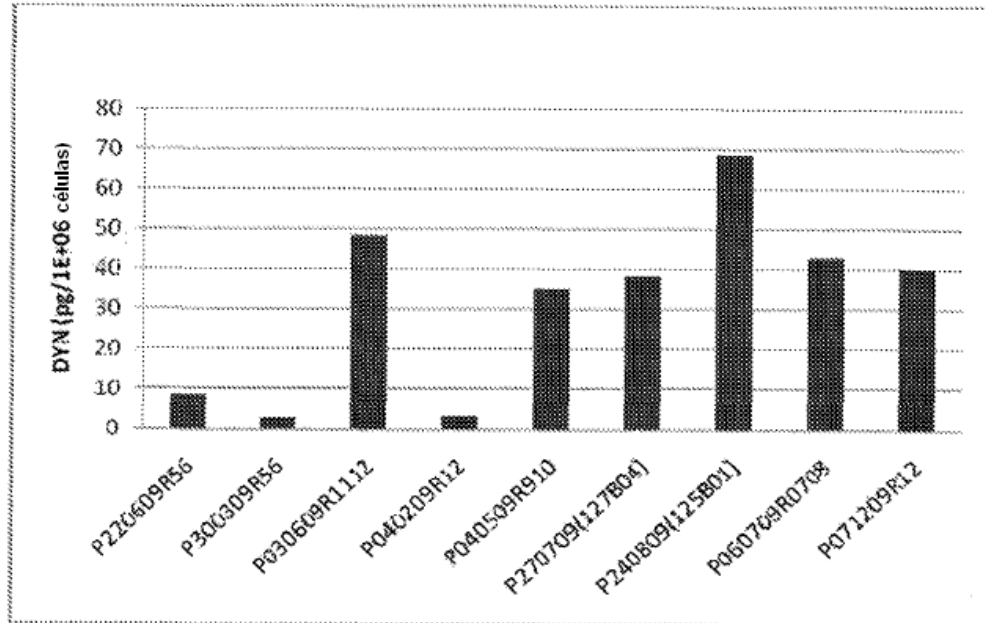


Fig. 12C

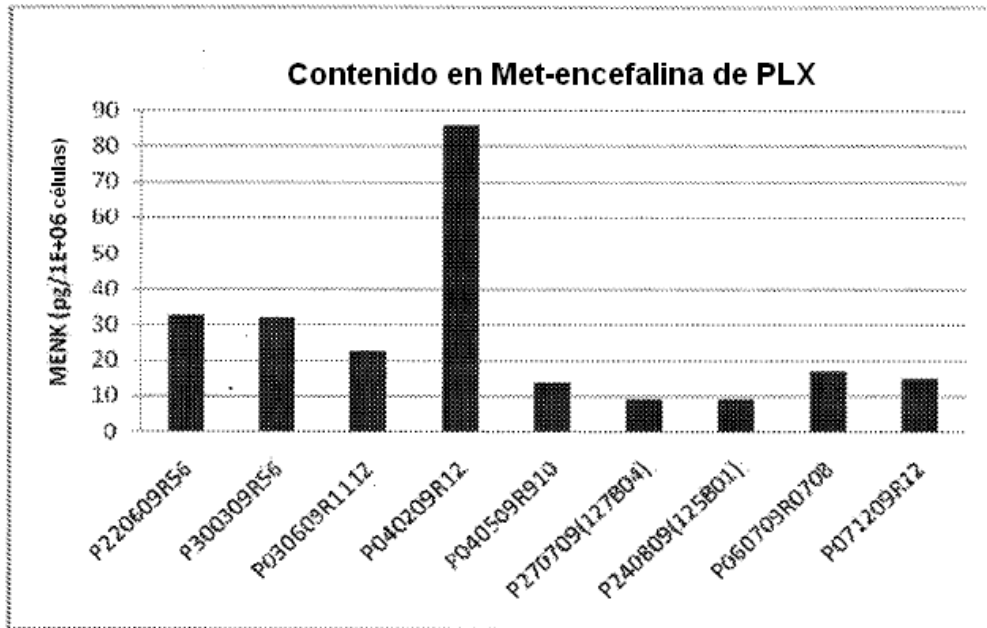


Fig. 12D

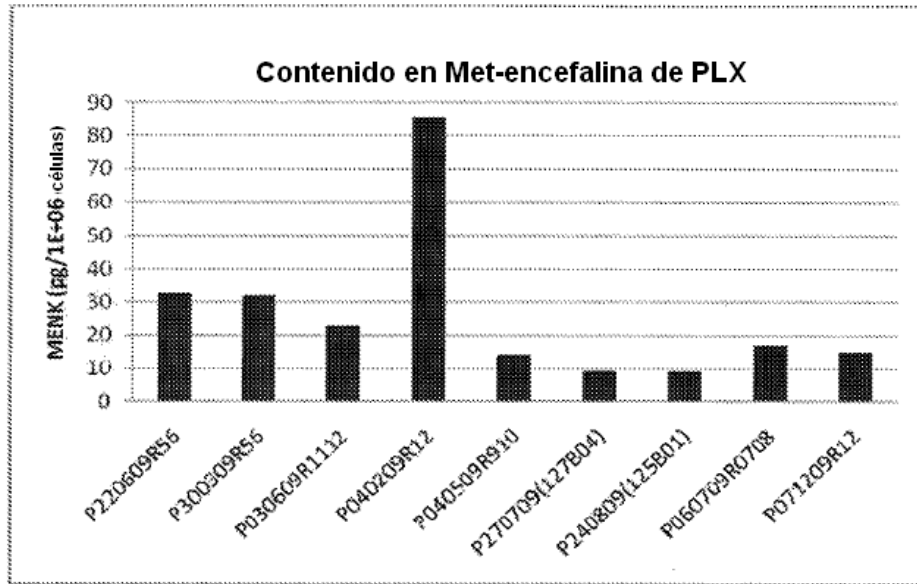


Fig. 12E

