

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 331**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**A61K 35/50** (2015.01)

**C12N 5/073** (2010.01)

**C12N 5/0775** (2010.01)

**A61K 35/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2011 PCT/US2011/065158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12083021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2011 E 11849864 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2652126**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con el sistema inmunitario usando células adherentes derivadas del amnios**

30 Prioridad:

**17.12.2010 US 201061424593 P**

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

**01.02.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ABBOT, STEWART;  
EDINGER, JAMES W.;  
FRANCKI, ALEKSANDAR;  
JANKOVIC, VLADIMIR y  
LIANG, BITAO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 599 331 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

Tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con el sistema inmunitario usando células adherentes derivadas del amnios

### Campo de la invención

5 En el presente documento, se proporcionan métodos de modulación, por ejemplo, reducción, de una respuesta inmunitaria, *in vivo* o *in vitro*, que comprenden poner en contacto uno o más tipos de células inmunitarias con una cantidad eficaz de células adherentes derivadas del amnios, denominadas AMDAC. También se proporcionan en el presente documento métodos de tratamiento de individuos que tienen una respuesta inmunitaria no deseada o inapropiada, por ejemplo, una enfermedad inmunitaria, enfermedad de injerto contra hospedador, alergia o asma, que comprenden administrar AMDAC a dichos individuos.

### Antecedentes de la invención

Las enfermedades y las afecciones inflamatorias y relacionadas con el sistema inmunitario tales como las enfermedades inmunitarias, la enfermedad de injerto contra hospedador, las alergias y el asma siguen siendo importantes problemas médicos. Hay una necesidad de mejorar los agentes terapéuticos para dichas afecciones.

### 15 Compendio de la invención

En un aspecto, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene, o que está en riesgo de desarrollar, una enfermedad o un trastorno asociado con o causado por una respuesta inmunitaria inapropiada o no deseada, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) o medio de cultivo acondicionado con AMDAC, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para provocar una mejora detectable en uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o afección, y en el que dichas AMDAC son OCT-4<sup>-</sup> (negativas para OCT-4, también conocidas como POU5F1 o proteína de unión a octámero 4) como se puede determinar mediante la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR), y se adhieren al plástico de cultivo tisular.

En una realización específica, la enfermedad o el trastorno está causado por o asociado con una respuesta proinflamatoria, por ejemplo, una respuesta de Th1 o una respuesta de Th17, y la administración de dichas AMDAC suprime dicha respuesta proinflamatoria, por ejemplo, dicha respuesta de Th1 o respuesta de Th17. En una realización específica, el método comprende poner en contacto linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T o leucocitos CD4<sup>+</sup>) que medien dicha respuesta de Th1 o Th17 con AMDAC. En una realización específica, dicha puesta en contacto de forma detectable reduce la maduración de los linfocitos Th1. En una realización específica del método, dicha puesta en contacto reduce de forma detectable la producción de uno o más de linfotóxina-1 $\alpha$  (LT-1 $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y/o interferón gamma (IFN $\gamma$ ) por dichos linfocitos T (por ejemplo, en dicho individuo) o por una célula productora de antígenos. En otra realización específica del método, dicho contacto potencia o regula positivamente un fenotipo regulador de linfocitos T (Treg) y/o reduce la expresión en una célula dendrítica (DC) y/o macrófagos de biomoléculas que potencian una respuesta de Th1 y/o de Th17 (por ejemplo, CD80, CD83, CD86, ICAM-1, HLA-II). En una realización específica, dichos linfocitos T también se ponen en contacto con IL-10, por ejemplo, IL-10 exógena o IL-10 no producida por dichos linfocitos T, por ejemplo, IL-10.

En una realización específica de cualquiera de los métodos de tratamiento anteriores, dicha enfermedad o dicho trastorno es una alergia, asma o una reacción a un antígeno exógeno a dicho individuo. En otra realización específica de cualquiera de los métodos de tratamiento anteriores, dicha enfermedad o dicho trastorno es la enfermedad de injerto contra hospedador.

En otra realización específica de cualquiera de los métodos de tratamiento anteriores, dicha enfermedad o dicho trastorno es una enfermedad inmunitaria. En ciertas realizaciones específicas, dicha enfermedad inmunitaria es una enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis, lupus eritematoso, diabetes, micosis fungoide o esclerodermia. En otras ciertas realizaciones específicas, dicha enfermedad inmunitaria es una o más de enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, síndrome antifosfolípido (primario o secundario), asma, gastritis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad del oído interno autoinmune, enfermedad linfoproliferativa autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, enfermedad de Balo, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, enfermedad celiaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, penfigoide cicatricial (por ejemplo, penfigoide de las mucosas), enfermedad por crioglobulinas, enfermedad de Degos, dermatitis hepatoforme, dermatomiositis (juvenil), crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto (enfermedad de Hashimoto; tiroiditis autoinmune), fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, enfermedad de Menière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, morfea, miastenia gravis, narcolepsia, neuromiotonía, trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunes (PANDA), pénfigo vulgar, anemia perniciosa, periarteritis nodosa, policondritis, polimialgia reumática, polimiositis (por ejemplo, con dermatomiositis), agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Raynaud (fenómeno de

Raynaud), síndrome de Reiter, policondritis recidivante, fiebre reumática, síndrome de Sjogren, síndrome del individuo rígida (síndrome Moersch-Woltmann), arteritis de Takayasu, arteritis temporal (arteritis de células gigantes), uveítis, vasculitis (por ejemplo, vasculitis no asociada al lupus eritematoso), vitiligo y/o granulomatosis de Wegener.

5 En una realización específica, en la que la enfermedad inmunitaria es la enfermedad inflamatoria intestinal, dicha enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn. En realizaciones más específicas, dicha enfermedad de Crohn es la enfermedad de Crohn gastroduodenal, yeyunoileitis, ileocolitis o colitis de Crohn. En otra realización específica, dicha enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa. En ciertas realizaciones específicas, dicha colitis ulcerosa es pancolitis, colitis limitada, colitis distal o proctitis. En ciertas realizaciones específicas, dicho síntoma de la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, enfermedad de Crohn, es uno o más entre inflamación e hinchazón de una parte del tracto gastrointestinal (GI), dolor abdominal, vaciado frecuente del intestino, diarrea, sangrado rectal, anemia, pérdida de peso, artritis, problemas de la piel, fiebre, engrosamiento de la pared intestinal, formación de tejido cicatricial en el intestino del individuo, formación de llagas o úlceras en el intestino del individuo, desarrollo de una o más fistulas en la pared intestinal del individuo, desarrollo de una o más fisuras en el ano del individuo, desarrollo de deficiencias nutricionales (por ejemplo, deficiencias en una o más de proteínas, calorías, vitaminas), desarrollo de cálculos renales o desarrollo de cálculos biliares. En otras ciertas realizaciones específicas, dicho síntoma de la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, colitis ulcerosa, es una o más de dolor abdominal, diarrea con sangre, fiebre, náuseas, calambres abdominales, anemia, fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, sangrado rectal, pérdida de fluidos corporales y nutrientes, lesiones en la piel, dolor en las articulaciones y deficiencias de crecimiento. En otra realización más específica, el síntoma es osteoporosis, inflamación ocular o enfermedad hepática.

En otra realización de los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento, dicha enfermedad o dicho trastorno es esclerodermia. En realizaciones específicas, la esclerodermia es esclerodermia difusa, esclerodermia limitada (síndrome CREST), morfea o esclerodermia lineal. En ciertas realizaciones específicas, dichos síntomas de la esclerodermia comprenden uno o más de endurecimiento de la piel del rostro, endurecimiento de la piel de los dedos, síndrome de Reynaud, vasoconstricción inapropiada en una extremidad, calcinosis, telangiectasia o alteración de la motilidad esofágica.

En otra realización de los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento, dicha enfermedad o dicho trastorno es soriasis. En ciertas realizaciones específicas, dicho síntoma de la soriasis es uno o más de artritis soriásica, descamación de la piel, enrojecimiento de la piel, engrosamiento de la piel, formación de placas, decoloración de la lámina ungueal, picadura de las uñas, líneas que atraviesan las uñas, engrosamiento de la piel debajo de la uña, onicolisis, desarrollo de pústulas, inflamación de las articulaciones o del tejido conjuntivo, inflamación de la piel o exfoliación de la piel.

En otra realización de los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento, dicha enfermedad o dicho trastorno es esclerosis múltiple. En ciertas realizaciones específicas, dicho síntoma de la esclerosis múltiple es una o más de una perturbación sensorial en una extremidad del individuo, disfunción del nervio óptico, disfunción del tracto piramidal, disfunción de la vejiga, disfunción intestinal, disfunción sexual, ataxia o diplopía.

En otra realización de los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento, dicha enfermedad o dicho trastorno es artritis reumatoide. En ciertas realizaciones específicas, dicha artritis reumatoide implica uno o más de pioderma gangrenoso, dermatosis neutrofílica, síndrome de Sweet, infección viral, eritema nudoso, paniculitis lobular, atrofia de la piel digital, eritema palmar, adelgazamiento difuso (piel de papel de arroz), fragilidad de la piel, nódulos subcutáneos sobre una superficie exterior, por ejemplo, en los codos, fibrosis de los pulmones (por ejemplo, como consecuencia del tratamiento con metotrexato), nódulos de Caplan, vasculitis, infartos con pliegue de uñas, neuropatía, nefropatía, amiloidosis, pseudohipertrofia muscular, endocarditis, insuficiencia del ventrículo izquierdo, valvulitis, escleromalacia, mononeuritis múltiple o subluxación atlanto-axial.

45 En otra realización de los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento, dicha enfermedad o dicho trastorno es lupus eritematoso. En ciertas realizaciones específicas, dicho síntoma del lupus eritematoso sistémico es uno o más de eritema malar, desarrollo de placas escamosas rojas gruesas en la piel, alopecia, úlceras en la boca, úlceras nasales, úlceras vaginales, lesiones en la piel, dolor en las articulaciones, deficiencia de anemia, deficiencia de hierro, recuentos de plaquetas y glóbulos blancos inferiores a los normales, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, presencia de anticuerpos anti-cardiolipina en la sangre, pericarditis, miocarditis, endocarditis, inflamación pulmonar, inflamación pleural, pleuritis, derrame pleural, neumonitis lúpica, hipertensión pulmonar, embolia pulmonar, hemorragia pulmonar, hepatitis autoinmune, ictericia, presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) en la sangre, presencia de anticuerpo del músculo liso (SMA) en la sangre, presencia de anticuerpo microsomal renal/hepático (LKM-1) en la sangre, presencia de anticuerpo anti-mitocondrial (AMA) en la sangre, hematuria, proteinuria, nefritis lúpica, insuficiencia renal, desarrollo de glomerulonefritis membranosa con anomalías de "asa de alambre", convulsiones, sicosis, alteraciones del líquido cefalorraquídeo, deficiencia de la fosfatasa CD45 y/o aumento de la expresión del ligando de CD40 en los linfocitos T del individuo, gastroenteritis lúpica, pancreatitis lúpica, cistitis lúpica, enfermedad inmunitaria del oído interno, disfunción parasimpática, vasculitis retinal, vasculitis sistémica, aumento de la expresión de FcγRIγ, niveles de calcio aumentados y sostenidos de los linfocitos T, aumento del trifosfato de inositol en la sangre, reducción de la fosforilación de la proteína quinasa C, reducción de la señalización de la Ras-MAP quinasa o una deficiencia en la actividad de la proteína quinasa AI.

En otra realización de los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento, dicha enfermedad o dicho trastorno es diabetes. En ciertas realizaciones específicas, dicho síntoma es uno o más de glucemia anormalmente elevada, falta de resistencia a la insulina determinada por un ensayo de la tolerancia a la glucosa, fatiga o pérdida de la conciencia.

5 En otra realización de los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento, dicha enfermedad, dicho trastorno o dicha afección es micosis fungoide (síndrome de Alibert-Bazin). En ciertas realizaciones específicas, dicha micosis fungoide está en la fase de parche, la fase de tumor de la piel, la fase de enrojecimiento de la piel (eritrodermia) o la fase de ganglios linfáticos. En otras ciertas realizaciones específicas, dicho síntoma de la micosis fungoide es uno o más de desarrollo de parches planos de color rojo que pican, desarrollo de parches planos, de  
10 color rojo, que crecen y son duros (placas), desarrollo de erupción cutánea (nódulos), desarrollo de grandes zonas escamosas de color rojo que pican sobre el cuerpo, agrietamiento de la piel de las palmas de las manos y las plantas de los pies, engrosamiento de la piel de las palmas de las manos y plantas de los pies o inflamación de los ganglios linfáticos.

Las AMDAC útiles en los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento se pueden identificar mediante diferentes combinaciones de marcadores celulares y genéticos. En una realización específica, por ejemplo, dichas AMDAC son OCT-4<sup>-</sup> según lo determinado mediante RT-PCR. En otra realización, las AMDAC son CD49f<sup>+</sup>, determinadas por citometría de flujo. En otra realización más, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup> y CD49f<sup>+</sup> según lo determinado mediante RT-PCR y citometría de flujo, respectivamente. En otra realización más, las AMDAC son CD49f<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, y CD200<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En  
20 otra realización, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup> según lo determinado mediante RT-PCR y CD49f<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas AMDAC son positivas para VEGFR1/Flt-1 (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular) o CD309 (también conocido como VEGFR2/KDR (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular)), según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas  
25 AMDAC son CD90<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup> según lo determinado mediante citometría de flujo, y HLA-G<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR. En otra realización específica, dichas AMDAC son OCT-4<sup>-</sup> y HLA-G<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y/o CD117<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, cualquiera de las AMDAC anteriores son, además, una o más de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup> (receptor de angiopoyetina), TEM-7<sup>+</sup> (marcador endotelial tumoral 7), CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup> o CXCR4<sup>-</sup> (receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C)) según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, cualquiera de las AMDAC anteriores son, además, CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup> y CXCR4<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo.

35 En otra realización específica, las AMDAC son GFAP<sup>+</sup>, por ejemplo, según lo determinado mediante un ensayo de diferenciación neuronal a corto plazo (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.3, más adelante). En otra realización específica, las AMDAC son beta-tubulina III (Tuj1)<sup>+</sup>, por ejemplo, según lo determinado mediante un ensayo de diferenciación neuronal a corto plazo (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.3, más adelante). En otra realización específica, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, GFAP<sup>+</sup> y beta-tubulina III (Tuj1)<sup>+</sup>. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son OCT-4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD49f<sup>+</sup>. En otra realización específica, las  
40 AMDAC son CD200<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> y CD73<sup>+</sup>. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son CD117<sup>-</sup> y no se seleccionan usando un anticuerpo contra CD117. En otra realización específica, las AMDAC son CD146<sup>-</sup> y no se seleccionan usando un anticuerpo contra CD146. En otra realización específica, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup> y no expresan CD34 tras la inducción con VEGF según lo determinado mediante RT-PCR y/o inmunolocalización (por ejemplo, citometría de flujo). En otra realización específica, dichas AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y CD49f<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD200<sup>+</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo.

En otra realización específica, las AMDAC útiles en los métodos descritos en el presente documento son neurogénicas, según lo determinado mediante un ensayo de diferenciación neuronal a corto plazo (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.3, más adelante). En otra realización específica, las AMDAC útiles en los métodos descritos en el presente documento son no condrogénicas, según lo determinado mediante un ensayo *in vitro* del potencial condrogénico (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.2, más adelante). En otra realización específica, las AMDAC útiles en los métodos descritos en el presente documento son no osteogénicas, según lo determinado mediante un ensayo de fenotipo osteogénico (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.1, más adelante). En otra realización  
50 específica, las AMDAC descritas en el presente documento son no osteogénicas tras haber sido cultivadas durante un máximo de 6 semanas (por ejemplo, durante 2 semanas, durante 4 semanas o durante 6 semanas) en DMEM a pH 7,4 (niveles altos de glucosa) complementado con dexametasona 100 nM, fosfato de β-glicerol 10 mM, L-ácido ascórbico-2-fosfato 50 μM, en el que la osteogénesis se evalúa mediante tinción de von Kossa; tinción con rojo alizarina; o mediante la detección de la presencia de la osteopontina, osteocalcina, osteonectina y/o sialoproteína ósea por, por ejemplo, RT-PCR.

En realizaciones más específicas, cualquiera de las AMDAC anteriores, además: (a) expresa uno o más de CD9, CD10, CD44, CD54, CD98, CD200, Tie-2, TEM-7, VEGFR1/Flt-1 o VEGFR2/KDR (CD309), según lo determinado

mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; (b) carece de la expresión de uno o más de CD31, CD34, CD38, CD45, CD133, CD143, CD144, CD146, CD271, CXCR4, HLA-G o VE-cadherina, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; (c) carece de la expresión de SOX2, según lo determinado mediante RT-PCR; (d) expresa ARNm para uno o más de ACTA2, ADAMTS1, AMOT, ANG, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL1, ANGPTL2, ANGPTL4, BAI1, c-myc, CD44, CD140a, CD140b, CD200, CD202b, CD304, CD309, CEACAM1, CHGA, COL15A1, COL18A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, Connexina-3, CSF3, CTGF, CXCL12, CXCL2, DNMT3B, ECGF1, EDG1, EDIL3, ENPP2, EPHB2, FBLN5, F2, FGF1, FGF2, FIGF, FLT4, FN1, FST, FOXC2, Galectina-1, GRN, HGF, HEY1, HSPG2, IFNB1, IL8, IL12A, ITGA4, ITGAV, ITGB3, KLF-4, MDK, MMP2, MYOZ2, NRP2, PDGFB, PF4, PGK1, PROX1, PTN, SEMA3F, SERPINB5, SERPINC1, SERPINF1, TGFA, TGFB1, THBS1, THBS2, TIE1, TIMP2, TIMP3, TNF, TNNC1, TNNT2, TNFSF15, VASH1, VEGF, VEGFB, VEGFC o VEGFR1/FLT1; (e) produce una o más de las proteínas CD49d, Connexina-43, HLA-ABC, beta 2-microglobulina, CD349, CD318, PDL1, CD106, Galectina-1, ADAM 17, precursor de angiotensinógeno, filamina A, alfa-actinina 1, megalina, receptor I y II de LDL acetilado de macrófagos, precursor de tipo IIB del receptor de activina, proteína Wnt-9, proteína ácida fibrilar glial, astrocitos, proteína C de unión a la miosina o cadena pesada de miosina, tipo A no muscular; (f) secretan uno o más de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleucina-8 (IL-8), proteína quimiotáctica de monocitos-3 (MCP-3), FGF2, Folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR o galectina-1 en medio de cultivo en el que crecen las AMDAC; (g) expresan uno o más de los micro ARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92 o miR-296 a un nivel superior a un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea; (h) expresan uno o más de los micro ARN miR-20a, miR-20b, miR-221, miR-222, miR-15b o miR-16 a un nivel inferior a un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea; (i) expresan uno o más de los miARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, miR-296, miR-221, miR-222, miR-15b y/o miR-16; o (j) expresan mayores niveles de uno o más de CD202b, IL-8 o VEGF cuando se cultiva en O<sub>2</sub> a menos de aproximadamente 5 % en comparación con la expresión de CD202b, IL-8 o VEGF cuando se cultiva en O<sub>2</sub> a 21 %. En una realización más específica, dichas AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y CD49f<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD200<sup>+</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y CD49f<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y en la que dichas AMDAC además: (a) expresan CD9, CD10, CD44, CD54, CD98, CD200, Tie-2, TEM-7, VEGFR1/Flt-1 y VEGFR2/KDR (CD309), según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; (b) carecen de la expresión de CD31, CD34, CD38, CD45, CD133, CD143, CD144, CD146, CD271, CXCR4, HLA-G y VE-cadherina, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; (c) carecen de la expresión de SOX2, según lo determinado mediante RT-PCR; (d) expresan ARNm para ACTA2, ADAMTS1, AMOT, ANG, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL1, ANGPTL2, ANGPTL4, BAI1, c-myc, CD44, CD140a, CD140b, CD200, CD202b, CD304, CD309, CEACAM1, CHGA, COL15A1, COL18A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, Connexina-3, CSF3, CTGF, CXCL12, CXCL2, DNMT3B, ECGF1, EDG1, EDIL3, ENPP2, EPHB2, FBLN5, F2, FGF1, FGF2, FIGF, FLT4, FN1, FST, FOXC2, Galectina-1, GRN, HGF, HEY1, HSPG2, IFNB1, IL8, IL12A, ITGA4, ITGAV, ITGB3, KLF-4, MDK, MMP2, MYOZ2, NRP2, PDGFB, PF4, PGK1, PROX1, PTN, SEMA3F, SERPINB5, SERPINC1, SERPINF1, TGFA, TGFB1, THBS1, THBS2, TIE1, TIMP2, TIMP3, TNF, TNNC1, TNNT2, TNFSF15, VASH1, VEGF, VEGFB, VEGFC y VEGFR1/FLT1, según lo determinado mediante RT-PCR; (e) producen las proteínas CD49d, Connexina-43, HLA-ABC, beta 2-microglobulina, CD349, CD318, PDL1, CD106, Galectina-1, ADAM 17, precursor de angiotensinógeno, filamina A, alfa-actinina 1, megalina, receptor I y II de LDL acetilado de macrófagos, precursor de tipo IIB del receptor de activina, proteína Wnt-9, proteína ácida fibrilar glial, astrocitos, proteína C de unión a la miosina y/o cadena pesada de miosina, tipo A no muscular; (f) secretan VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, Folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, y Galectina-1 en medio de cultivo en el que crecen las células; (g) expresan micro ARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92 y miR-296 a un nivel superior a un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea; (h) expresan micro ARN miR-20a, miR-20b, miR-221, miR-222, miR-15b y miR-16 a un nivel inferior a un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea; (i) expresan miARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, miR-296, miR-221, miR-222, miR-15b y miR-16; o (j) expresan mayores niveles de CD202b, IL-8 y/o VEGF cuando se cultivan en O<sub>2</sub> a menos de aproximadamente 5 % en comparación con la expresión de CD202b, IL-8 y/o VEGF en O<sub>2</sub> a 21 %.

En otras realizaciones, por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios se adhieren al plástico de cultivo tisular, y son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR durante 30 ciclos, por ejemplo, en comparación con una línea celular de control apropiada, tal como una línea de células madre derivada de carcinoma embrionario (por ejemplo, NTERA-2, por ejemplo, disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo, número de ATCC CRL-1973). En una realización específica, las células son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular) y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup> (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular, también conocido como receptor de dominio de inserción de quinasa), según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, las células son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y CD49f<sup>+</sup> (Integrina- $\alpha 6$ ), según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización específica, dichas células son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y HLA-G<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR. En otra realización específica, dichas células son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> o CD117<sup>-</sup> según

lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización más específica, dichas células OCT-4<sup>-</sup> son CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>. En otra realización específica, las células son OCT-4<sup>-</sup>, y no expresan SOX2, por ejemplo, según lo determinado mediante RT-PCR durante 30 ciclos.

5 En otra realización, dichas células OCT-4<sup>-</sup> son uno o más de CD29<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, ABC-p<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo.

10 En otra realización específica, dichas células adherentes derivadas del amnios OCT-4<sup>-</sup> son, además, uno o más de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup> (receptor de angiopoyetina), TEM-7<sup>+</sup> (marcador endotelial tumoral 7), CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup> (enzima convertidora de la angiotensina I, ACE), CD146<sup>-</sup> (molécula de adhesión a células de melanoma), CXCR4<sup>-</sup> (receptor 4 de quimiocina (motivo C-X-C)) según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización más específica, dichas células adherentes derivadas del amnios son CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup> y CXCR4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización más específica, las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR; VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; y uno o más, o todos, de CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y/o Tie-2<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización específica, las células adherentes derivadas del amnios expresan al menos 2 registros menos de ARNm amplificado por PCR para OCT-4 en, por ejemplo, > 20 ciclos (por ejemplo, 20-30 ciclos), de un número equivalente de células NTERA-2. En otra realización específica, dichas células OCT-4<sup>-</sup> son, además, VE-cadherina<sup>-</sup> (CD144<sup>-</sup>) según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas células OCT-4<sup>-</sup> son positivas además para CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas células OCT-4<sup>-</sup> no expresan CD34, por ejemplo, detectado por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo tras la exposición a 1 a 100 ng/ml de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) de 4 a 21 días.

25 En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios se adhieren al plástico de cultivo tisular, y son OCT-4<sup>-</sup> y SOX-2<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR. En otra realización más, dichas células son CD90<sup>+</sup>, DC 105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En realizaciones específicas, las células adherentes derivadas del amnios OCT-4<sup>-</sup>, SOX-2<sup>-</sup> son, además, HLA-G<sup>-</sup> o CD271<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización más específica, dichas células son OCT-4<sup>-</sup> y SOX-2<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR; y CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD271<sup>-</sup> y HLA-G<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo.

30 En otra realización de, y además de, cualquiera de las AMDAC anteriores, dicha célula se adhiere al plástico de cultivo tisular, y es positiva para CD309 (también conocida como VEGFR2/KDR<sup>+</sup>).

35 Las células adherentes derivadas del amnios útiles en los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento, en otra realización, se adhieren al plástico de cultivo tisular, son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR en, por ejemplo, > 20 ciclos, tal como 20-30 ciclos, y son uno o más de VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> o VE-cadherina<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización específica, dichas células son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR en, por ejemplo, >20 ciclos, por ejemplo, 20-30 ciclos, y VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y VE-cadherina<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, las células no expresan CD34, por ejemplo, como se detecta por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, tras la exposición a 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días.

45 En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios son OCT-4<sup>-</sup>, CD49f<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>. En una realización más específica, dichas células son uno o más de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup> (molécula de adhesión a células de melanoma) o CXCR4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización más específica, dichas células son CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup> y CXCR4<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas células son VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; y uno o más de CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y/o Tie-2<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dicha célula es, además, VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup>, VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y Tie-2<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo.

55 En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios desveladas en el presente documento no expresan ARNm para uno o más de ANGPT4, ANGPTL3, BGLAP, CD31, CD34, CDH5, CXCL10, DLX5, FGA, FGF4, FLT3, HLA-G, IFNG, LECT1, LEP, MMP-13, NANOG, Nestina, PLG, POU5F1, PRL, PROK1, SOX2, TERT, TNMD y/o XLKD1, según lo determinado por RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos. En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento no expresan constitutivamente uno o más de cadena invariante, HLA-DR-DP-DQ, CD6 o CD271, según lo determinado mediante citometría de flujo, es decir, las células adherentes derivadas del amnios no expresan estos marcadores en condiciones normales, no

estimuladas.

En una realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son telomerasa<sup>-</sup>, según lo medido mediante, por ejemplo, RT-PCR y/o ensayos de protocolo de amplificación de repetición telomérica (TRAP). En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento no expresan ARNm para la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), según lo determinado mediante RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son NANOG<sup>-</sup>, según lo medido mediante RT-PCR. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento no expresan ARNm para NANOG según lo determinado mediante RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos. En una realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son (región determinante del sexo Y)-box 2 (SOX2)<sup>-</sup>. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento no expresan ARNm para SOX2, según lo determinado mediante RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos.

En el presente documento, se proporciona además una población aislada de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios, en la que la población de células es terapéuticamente eficaz en los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento. Dichas poblaciones de células pueden comprender cualquiera de las células adherentes derivadas del amnios descritas por cualquiera de las combinaciones de marcadores, según lo desvelado en el presente documento. En realizaciones específicas, al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células de dicha población es dichas células adherentes derivadas del amnios. En otras realizaciones específicas, al menos 25 %, 35 %, 45 %, 50 %, 60 %, 75 %, 85 % o más de las células de la población aislada de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios no son OCT-4<sup>+</sup>.

En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento comprenden además la administración de un segundo tipo de célula madre a dicho individuo. En una realización específica, la población aislada de células adherentes derivadas del amnios comprende además un segundo tipo de célula, por ejemplo, células madre o células progenitoras. En realizaciones específicas, las AMDAC desveladas en el presente documento comprenden al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o al menos 98 % de las células de dicha población. En otras realizaciones específicas, al menos 25 %, 35 %, 45 %, 50 %, 60 %, 75 %, 85 % o más de las células de la población de células que comprende células adherentes derivadas del amnios y un segundo tipo de célula no son OCT-4<sup>+</sup>. En una realización específica, el segundo tipo de células está contenido dentro o aislado de sangre de la placenta, sangre del cordón umbilical, médula ósea en bruto u otros tejidos. En una realización más específica, dicho segundo tipo de células es células madre embrionarias, células madre aisladas de la sangre periférica, células madre aisladas de la sangre de la placenta, células madre aisladas de líquido de perfusión placentario, células madre aisladas de tejido placentario, células madre aisladas de cordón umbilical, células madre de cordón umbilical (por ejemplo, células madre de matriz de cordón umbilical o de la gelatina de Wharton), células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, células mesenquimales del estroma, células madre o células progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, células CD34<sup>+</sup>, células madre somáticas, células madre de tejido adiposo, células madre pluripotentes inducidas o similares. En otra realización más específica, dicho segundo tipo de células comprende al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % de células de dicha población.

En otra realización específica, cualquiera de las anteriores AMDAC, o del segundo tipo de células, proliferan, o se han hecho proliferar, en cultivo. En otra realización específica, cualquiera de las células anteriores son de un cultivo de dichas células que se ha pasado al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces, o más. En otra realización específica, cualquiera de las células anteriores son de un cultivo de dichas células que se ha duplicado al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o al menos 50 veces, o más.

En otras realizaciones, los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento comprenden administrar las AMDAC a un individuo afectado, en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica. En realizaciones específicas, la composición es una matriz o un almacén, por ejemplo, una matriz o un almacén de tejido natural, por ejemplo, una matriz o un almacén de tejido descelularizado permanente o degradable; o matriz o almacén sintético. En una realización más específica, dicha matriz o dicho almacén está conformado en forma de una perla, un tubo u otra forma tridimensional. En otra realización más específica, dicha matriz es una matriz de tejido descelularizado. En otra realización específica, la composición comprende una o más de las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento, o población de células que comprende las células adherentes derivadas del amnios, en una solución fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una solución salina, medio de cultivo o similares.

En otra realización específica de los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento, dichas células se administran a dicho individuo por inyección. En otra realización específica, dichas células se administran a dicho individuo por infusión intravenosa. En otra realización específica del método de tratamiento, dichas células se administran a dicho individuo por implantación en dicho individuo de una matriz o almacén que comprende células adherentes derivadas del amnios, según lo descrito anteriormente.

Las células adherentes derivadas del amnios aisladas y las poblaciones de células proporcionadas en el presente documento no son las células o poblaciones de células madre placentarias aisladas descritas, por ejemplo, en la

patente de EE.UU. n.º 7.255.879 o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2007/0275362, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Las células adherentes derivadas del amnios aisladas proporcionadas en el presente documento tampoco son las células endoteliales progenitoras, células epiteliales amnióticas, trofoblastos, citotrofoblastos, células germinales embrionarias, células madre embrionarias, células obtenidas a partir de la masa celular interna de un embrión o células obtenidas a partir de la cresta gonadal de un embrión.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa, por ejemplo, en 10 % de una cifra o valor indicado.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre" define las propiedades funcionales de cualquier población de células dada que pueda proliferar extensivamente, por ejemplo, hasta aproximadamente 40 duplicaciones de la población, pero no necesariamente hasta el infinito, y que se pueda diferenciar, por ejemplo, que se pueda diferenciar *in vitro*, en múltiples tipos de células.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula progenitora" define las propiedades funcionales de cualquier población de células dada que pueda proliferar extensivamente, por ejemplo, hasta aproximadamente 40 duplicaciones de la población, pero no necesariamente hasta el infinito, y que se pueda diferenciar, por ejemplo, que se pueda diferenciar *in vitro*, en un conjunto restringido de tipos de células, que, en general, está más restringido que el de una célula madre.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado/a" significa aislado/a de o purificado/a de otra manera. Por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios están aisladas del amnios. El término "derivado/a" abarca células que son cultivadas a partir de células aisladas directamente de un tejido, por ejemplo, del amnios, y las células cultivadas o expandidas de aislados primarios.

Como se usa en el presente documento, "inmunolocalización" significa detección de un compuesto, por ejemplo, un marcador celular, usando una proteína inmune, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo en, por ejemplo, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia, clasificación celular magnética, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica, o similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células aisladas" significa células, por ejemplo, AMDAC, que están esencialmente separadas de otras células del tejido, por ejemplo, del amnios, del que se obtienen o se derivan las células. Las células están "aisladas" si al menos aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos aproximadamente 99 % de otras células, con las que las células se asocian de forma natural, se retira de las células, por ejemplo, durante la extracción y/o el cultivo de las células.

Como se usa en el presente documento, la expresión "población aislada de células" significa una población de células que está esencialmente separada de otras células del tejido, por ejemplo, amnios o placenta, del que se obtiene o se deriva la población de células. Una población de células está "aislada" si al menos aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos 99 % de las células con las que la población de células, o las células de las que deriva la población de células, está asociada de forma natural, se retira de la célula, por ejemplo, durante la extracción y/o el cultivo de células adherentes derivadas del amnios.

Como se usa en el presente documento, una célula o una población de células es "positiva" para un según lo determinado marcador cuando ese marcador es detectable por encima del fondo, por ejemplo, por inmunolocalización, por ejemplo, por citometría de flujo; o por RT-PCR, etc. Por ejemplo, una célula o una población de células se describen como positivas para, por ejemplo, CD105 si CD105 es detectable en la célula o en la población de células, en una cantidad detectablemente superior al fondo (en comparación con, por ejemplo, un control de isotipo). En el contexto de, por ejemplo, la detección mediada por anticuerpos, "positivo/a", como indicación de que un según lo determinado marcador de superficie celular está presente, significa que el marcador es detectable usando un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo marcado fluorescentemente, específico de ese marcador; "positivo/a" también significa que una célula o una población de células muestra ese marcador en una cantidad que produce una señal, por ejemplo, en un citómetro, ELISA o similar, que se detecta por encima del fondo. Por ejemplo, una célula es "CD105<sup>+</sup>" cuando la célula se marca de manera detectable con un anticuerpo específico contra CD105, y la señal del anticuerpo es detectablemente superior a un control, por ejemplo, el fondo). Por el contrario, "negativo/a", en el mismo contexto, significa que el marcador de superficie celular no es detectable usando un anticuerpo específico para ese marcador en comparación con el fondo. Por ejemplo, una célula o una población de células es "CD34<sup>-</sup>", cuando la célula o la población de células no se marcan de forma detectable con un anticuerpo específico de CD34. A menos que se indique lo contrario, en el presente documento, los agrupamientos de marcadores de diferenciación ("DC") se detectan usando anticuerpos. Por ejemplo, se puede determinar la presencia de OCT-4, y una célula es OCT-4<sup>+</sup> si se detecta ARNm para OCT-4<sup>-</sup> mediante RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos.

### Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra la expresión de genes relacionados con las células madre por parte de células adherentes derivadas del amnios y células NTERA-2.



La FIG. 2 muestra la expresión de TEM-7 en la superficie celular de células adherentes derivadas del amnios (AMDAC).

Las FIG. 3A-3D muestran la secreción de proteínas angiogénicas seleccionadas por parte de células adherentes derivadas del amnios. FIG. 3A: secreción por parte de AMDAC de paso seis (n = 3) de inhibidor tisular de la metaloproteasa-1 (TIMP-1), TIMP-2, trombopoyetina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y VEGF-D. FIG. 3B: secreción por parte de AMDAC de paso seis (n = 3) de la angiogenina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), péptido activador de neutrófilos epiteliales 78 (ENA-78), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), y oncogén alfa regulado por el crecimiento (GRO). FIG. 3C: secreción por parte de AMDAC de paso seis (n = 3) de interferón gamma (IFN-gamma), factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1), interleucina-6 (IL-6), IL-8 y leptina. FIG. 3D: secreción por parte de AMDAC de paso seis (n = 3) de proteína quimiotáctica 1 de monocitos (MCP-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-BB, factor de crecimiento placentario (P1GF), RANTES y factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta).

La FIG. 4 demuestra la capacidad de las AMDAC para inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro*. NHDF: fibroblastos dérmicos humanos neonatales. Barras hacia la izquierda para AMDAC, NHDF: supresión de células T CD4+ en comparación con la ausencia de AMDAC o NHDF. Barras hacia la derecha para AMDAC, NHDF: supresión de linfocitos T CD8 + en comparación con la ausencia de AMDAC o NHDF. Eje Y: porcentaje de supresión atribuible a las AMDAC o las NHDF en comparación con la proliferación de los linfocitos T en ausencia de AMDAC o NHDF.

La FIG. 5 demuestra que los medios acondicionados con AMDAC inducen la supresión de la producción de TNF-alfa por los linfocitos T. Eje Y: porcentaje de supresión de la producción de TNF- $\alpha$  por linfocitos T en masa en presencia de AMDAC o NHDF en comparación con la producción de TNF- $\alpha$  en ausencia de AMDAC o NHDF.

La FIG. 6 muestra la supresión realizada por las AMDAC de los linfocitos T Th1. Base en T del recipiente: porcentaje de linfocitos T Th1 en ausencia de AMDAC. 100 K, 75 K, 50 K, 25 K: porcentaje de linfocitos T Th1 en presencia de 100.000, 75.000, 50.000 y 25.000 AMDAC, respectivamente.

La FIG. 7 muestra la supresión realizada por las AMDAC de linfocitos T Th17 en una forma dependiente de la dosis. 100 K, 80 K, 60 K, 40 K: porcentaje de linfocitos T Th17 (en ausencia de AMDAC) que queda tras el cultivo conjunto con 100.000, 80.000, 60.000 y 40.000 AMDAC, respectivamente.

La FIG. 8 muestra el aumento de células Treg FoxP3 realizado por las AMDAC. Valor basal: porcentaje de células Treg FoxP3 en los linfocitos T totales en ausencia de AMDAC. 100 K, 75 K, 50 K, 25 K: porcentaje de células Treg FoxP3 en presencia de 100.000, 75.000, 50.000 y 25.000 AMDAC, respectivamente.

Las FIG. 9A-9C representan los resultados de la citometría de flujo de poblaciones de DC de acuerdo con la evaluación de la expresión de CD86 y HLA-DR. Todos: SSC: ventana de análisis de dispersión lateral. Tipo de células: células dendríticas (DC) solo, o DC + AMDAC. LPS + IFN- $\gamma$ : células estimuladas (+) o no estimuladas (-) con lipopolisacárido bacteriano e interferón gamma. FIG. 9A: DC marcadas con ficoeritrina anti-CD86 (PE). FIG. 9B: DC marcadas con Cy5.5 anti-HLA-DR-PerCP. FIG. 9C: DC marcadas con anti-IL-12-PE (eje Y) y anti-DC 11c-FITC.

La FIG. 10 ilustra la supresión de la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-12 (IL-12 por células dendríticas (DC) estimuladas por lipopolisacárido bacteriano (LPS). Para cada condición (producción de IL-12 o TNF- $\alpha$ ), la columna de la izquierda es la producción de la citocina por las DC en presencia de LPS e interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), y la columna de la derecha es la producción de la citocina por las DC en presencia de LPS, IFN- $\gamma$  y AMDAC. "□ -" indica la condición en la que las DC no fueron estimuladas con LPS o IFN- $\gamma$ . Los números de la derecha de cada condición indican el número de picogramos de IL-12 o TNF- $\alpha$  producidos por las DC en cada condición.

La FIG. 11 representa la supresión mediada por AMDAC de la proliferación de linfocitos citolíticos naturales (NK). Eje X: número de días de cultivo de precursores de linfocitos NK con (barras de la izquierda) o sin (barras de la derecha) AMDAC. Eje Y: número de linfocitos NK cada día del cultivo indicado.

La FIG. 12 representa la supresión por parte de las AMDAC de la citotoxicidad de los linfocitos NK. Eje X: número de AMDAC por pocillo en un cultivo conjunto con linfocitos NK y células K562 (una línea celular de leucemia mielógena inmortalizada humana) como dianas. Eje Y: porcentaje de citotoxicidad de NK, calculada como  $(1 - \text{número total de células K562 de la muestra} / \text{células K562 totales de un control que no contiene linfocitos NK}) \times 100$ .

La FIG. 13 muestra que, en un modelo de esclerosis múltiple de ratón, los ratones que recibieron AMDAC (G9) mostraron una mejora clara frente a los ratones que recibieron vehículo de control (G1) durante los Días 12-24 del tratamiento (13A), y que los pesos corporales de los ratones fueron superiores en los ratones tratados con AMDAC durante los Días 12-28 del tratamiento (13B).

La FIG. 14 muestra que, en un modelo de esclerosis múltiple de ratón, los ratones que recibieron AMDAC (G9) desarrollaron síntomas más tarde que los ratones que solo recibieron vehículo de control (G1).

## Descripción detallada

### 5.1 INMUNOMODULACIÓN USANDO CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

En un aspecto, en el presente documento, se proporcionan métodos de modulación, por ejemplo, de la supresión, de la actividad, por ejemplo, de la proliferación, de una célula inmunitaria o de una pluralidad de células inmunitarias, mediante la puesta en contacto de la/s célula/s inmunitaria/s con una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) descritas en el presente documento. Las células inmunitarias pueden ser células *in vitro*, o pueden ser parte de una respuesta inmunitaria *in vivo*. En ciertas realizaciones, en el presente documento, se proporciona un método de supresión de una respuesta inmunitaria en un individuo, en el que la respuesta inmunitaria es, por ejemplo, una enfermedad inmunitaria, la enfermedad de injerto contra hospedador, asma o una alergia, que comprende poner en contacto una pluralidad de células inmunitarias del individuo que forman parte de la respuesta inmunitaria con una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios durante un tiempo suficiente para dichas células adherentes derivadas del amnios supriman de forma detectable la respuesta inmunitaria, por ejemplo, en el que dichas células adherentes derivadas del amnios supriman de forma detectable la proliferación de linfocitos T en, por ejemplo, un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR) o un ensayo de regresión.

Las células adherentes derivadas del amnios útiles en la modulación de una respuesta inmunitaria o la actividad de las células inmunitarias son las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento (véase el apartado 5.4). Las células adherentes derivadas del amnios usadas para la inmunosupresión se pueden derivar u obtener del amnios de una sola placenta o de los amnios de varias placentas. Las células adherentes derivadas del amnios usadas para la inmunosupresión también se pueden derivar de una sola especie, por ejemplo, la especie del receptor o de la especie de las células inmunitarias cuya función se va a reducir o suprimir, o se pueden derivar de múltiples especies.

Una "célula inmunitaria" en el contexto de dicho método y de los métodos desvelados en el presente documento, significa cualquier célula del sistema inmunitario, en particular, linfocitos T y linfocitos citolíticos naturales (NK). Por lo tanto, en diversas realizaciones del método, las células adherentes derivadas del amnios se ponen en contacto con una pluralidad de células inmunitarias, en el que la pluralidad de las células inmunitarias son, o comprenden, una pluralidad de linfocitos T (por ejemplo, una pluralidad de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o linfocitos T CD8<sup>+</sup>) y/o linfocitos citolíticos naturales. Una "respuesta inmunitaria", en el contexto del método, puede ser cualquier respuesta de una célula inmunitaria a un estímulo normalmente percibido por una célula inmunitaria, por ejemplo, una respuesta a la presencia de un antígeno. En diversas realizaciones, una respuesta inmunitaria puede ser la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o linfocitos T CD8<sup>+</sup>) como parte de una enfermedad inmunitaria, enfermedad de injerto contra hospedador, alergia o asma. La respuesta inmunitaria también puede ser cualquier actividad de un linfocito citolítico natural (NK), la maduración de una célula dendrítica, o similares. La respuesta inmunitaria también puede ser un efecto local, específico de un tejido o de un órgano, o sistémico de una actividad de una o más clases de células inmunitarias, por ejemplo, la respuesta inmunitaria puede ser la inflamación, la formación de tejido cicatricial relacionado con la inflamación, y similares.

"Puesta en contacto", en el contexto de los métodos proporcionados en el presente documento, abarca unir las células adherentes derivadas del amnios y las células inmunitarias en un solo recipiente (por ejemplo, placa de cultivo, matraz, vial, etc.) o *in vivo*, por ejemplo, en el mismo individuo (por ejemplo, mamífero, por ejemplo, ser humano). En una realización preferida, la puesta en contacto es durante un tiempo suficiente y con un número suficiente de células adherentes derivadas del amnios y células inmunitarias, de manera que se pueda detectar un cambio en una función inmunológica de las células inmunitarias. Más preferentemente, en varias realizaciones, dicha puesta en contacto es suficiente para suprimir la función inmunitaria (por ejemplo, la proliferación de linfocitos T en respuesta a un antígeno) en al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %, en comparación con la función inmunitaria en ausencia de las células adherentes derivadas del amnios. Dicha supresión, en un contexto *in vivo*, se puede determinar en un ensayo *in vitro* (véase más adelante); es decir, el grado de supresión en el ensayo *in vitro* se puede extrapolar, para un número según lo determinado de células adherentes derivadas del amnios y un número de células inmunitarias en un individuo receptor, a un grado de supresión en el individuo.

En ciertas realizaciones, en el presente documento, se proporcionan métodos de uso de las células adherentes derivadas del amnios para modular una respuesta inmunitaria o la actividad de una pluralidad de uno o más tipos de células inmunitarias, *in vitro*. La puesta en contacto de las células adherentes derivadas del amnios y la pluralidad de células inmunitarias puede comprender combinar las células adherentes derivadas del amnios y las células inmunitarias en el mismo espacio físico, de modo que al menos una parte de la pluralidad de las células adherentes derivadas del amnios interactúa con al menos una parte de la pluralidad de las células inmunitarias; mantener las células adherentes derivadas del amnios y las células inmunitarias en espacios físicos separados con medio común; o puede comprender poner en contacto medio de una o de un cultivo de células adherentes derivadas del amnios o células inmunitarias con el otro tipo de célula (por ejemplo, obtener un medio de cultivo de un cultivo de células adherentes derivadas del amnios y volver a suspender las células inmunitarias aisladas en el medio). En un ejemplo específico, la puesta en contacto se realiza en una reacción linfocitaria mixta (MLR). En otro ejemplo específico, la puesta en contacto se realiza en un ensayo de regresión o un ensayo de reacción de linfocitos T con perlas (BTR).

Dicha puesta en contacto puede tener lugar, por ejemplo, en un entorno experimental diseñado para determinar el grado en que una determinada pluralidad de células adherentes derivadas del amnios es inmunomoduladora, por ejemplo, inmunosupresora. Dicho entorno experimental puede ser, por ejemplo, una reacción linfocitaria mixta (MLR) o un ensayo de regresión. Los procedimientos de realización de los ensayos de MLR y de regresión son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo Schwarz, "The Mixed Lymphocyte Reaction: An In Vitro Test for Tolerance", *J. Exp. Med.* 127(5):879-890 (1968); Lacerda *et al.*, "Human Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Home Preferentially to and Induce Selective Regressions of Autologous EBV-Induced B Lymphoproliferations in Xenografted C.B-17 Scid/Scid Mice", *J. Exp. Med.* 183:1215-1228 (1996). En una realización preferida, se realiza una MLR en la que se ponen en contacto pluralidades de células adherentes derivadas del amnios con una pluralidad de células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos, por ejemplo, linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup>).

La MLR se puede usar para determinar la capacidad inmunosupresora de una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios. Por ejemplo, se puede ensayar una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios en una MLR comprende la combinación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, células dendríticas (DC) y células adherentes derivadas del amnios en una proporción, por ejemplo, de aproximadamente 10:1:2, en la que los linfocitos T se tiñen con un colorante tal como, por ejemplo, CFSE que se divide en células hijas, y en el que se deja que los linfocitos T proliferen durante aproximadamente 6 días. La pluralidad de células adherentes derivadas del amnios es inmunosupresora si la proliferación de los linfocitos T a los 6 días en presencia de células adherentes derivadas del amnios se reduce de forma detectable en comparación con la proliferación de linfocitos T en presencia de DC y ausencia de células adherentes derivadas del amnios. En dicha MLR, las células adherentes derivadas del amnios bien se descongelan o se recogen del cultivo. Se vuelven a suspender aproximadamente 20.000 células adherentes derivadas del amnios en 100 µl de medio (RPMI 1640, tampón HEPES 1 mM, antibióticos y suero humano agrupado a 5 %) y se permite la unión a la parte inferior de un pocillo durante 2 horas. Se aíslan linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> de células mononucleares de sangre periférica enteras usando perlas magnéticas Miltenyi. Las células se tiñen con CFSE, y se añade un total de 100.000 linfocitos T (linfocitos T CD4<sup>+</sup> solos, linfocitos T CD8<sup>+</sup> solos o la misma cantidad de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) por pocillo. Se lleva el volumen del pocillo a 200 µl, y se deja proceder la MLR.

En una realización, por lo tanto, en el presente documento, se proporciona un método de supresión de una respuesta inmunitaria que comprende poner en contacto una pluralidad de células inmunitarias con una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios durante un tiempo suficiente para que dichas células adherentes derivadas del amnios supriman de forma detectable la proliferación de los linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR), un ensayo de reacción de linfocitos T con perlas (BTR) o en un ensayo de regresión. En una realización, dichas células adherentes derivadas del amnios usadas en los ensayos de MLR, BTR o regresión representan una muestra o alícuota de células adherentes derivadas del amnios de una población mayor de células adherentes derivadas del amnios.

Las poblaciones de células adherentes derivadas del amnios obtenidas de diferentes placentas o de diferentes tejidos de una misma placenta pueden diferir en su capacidad para modular una actividad de una célula inmunitaria, por ejemplo, pueden diferir en su capacidad para suprimir la actividad o proliferación de los linfocitos T, o la actividad de los linfocitos NK. Por lo tanto, es deseable determinar, antes de su uso, la capacidad de una determinada población de células adherentes derivadas del amnios para la inmunosupresión. Dicha capacidad se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de una muestra de la población de células adherentes derivadas del amnios en un ensayo de MLR o de regresión. En una realización, se realiza una MLR con la muestra, y se determina el grado de inmunosupresión en el ensayo atribuible a las células adherentes derivadas del amnios. Entonces, este grado de inmunosupresión se puede atribuir a la población de células adherentes derivadas del amnios que se muestrea. Por lo tanto, la MLR se puede usar como un método de determinación de la capacidad absoluta y relativa de una determinada población de células adherentes derivadas del amnios para suprimir la función inmunitaria. Los parámetros de la MLR se pueden variar para proporcionar más datos o para determinar mejor la capacidad de una muestra de células adherentes derivadas del amnios para inmunosuprimirse. Por ejemplo, debido a que la inmunosupresión por parte de las células adherentes derivadas del amnios parece aumentar aproximadamente en proporción al número de células adherentes derivadas del amnios presentes en el ensayo, la MLR se puede realizar con, en una realización, dos o más números de células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo,  $1 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y/o  $3 \times 10^4$  células adherentes derivadas del amnios por reacción. El número de células adherentes derivadas del amnios con respecto al número de linfocitos T en el ensayo también se puede variar. Por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios y los linfocitos T pueden estar presentes en el ensayo en cualquier proporción de, por ejemplo, aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100, preferentemente de aproximadamente 1:5, aunque se puede usar un número relativamente superior de células adherentes derivadas del amnios o de linfocitos T.

El ensayo de regresión o ensayo de BTR se pueden usar de manera similar.

Por lo tanto, en el presente documento, se proporcionan métodos de uso de las células adherentes derivadas del amnios para modular una respuesta inmunitaria o la actividad de una pluralidad de uno o más tipos de células inmunitarias, *in vivo*. Las células adherentes derivadas del amnios y las células inmunitarias pueden ponerse en contacto, por ejemplo, en un individuo que sea un receptor de una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios. Cuando se realiza la puesta en contacto en un individuo, en una realización, la puesta en contacto es entre

células adherentes derivadas del amnios exógenas (es decir, células adherentes derivadas del amnios no derivadas del individuo o de un amnios asociado con el individuo; células alogénicas) y una pluralidad de células inmunitarias endógenas para el individuo. En otras realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios que son endógenas para el individuo, por ejemplo, que comparten identidad genética con el individuo, por ejemplo, son autólogas para el individuo. En realizaciones específicas, las células inmunitarias del individuo son linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup>, linfocitos T CD8<sup>+</sup> y/o linfocitos NK.

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden administrar al individuo en una proporción, con respecto al número conocido o esperado de células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T, en el individuo, de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferentemente de aproximadamente 1:5. Sin embargo, se puede administrar una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios a un individuo en una proporción de, en ejemplos no limitantes, aproximadamente 10.000:1, aproximadamente 1.000:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:1.000 o aproximadamente 1:10.000. En general, se pueden administrar de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  células adherentes derivadas del amnios por kilogramo del receptor, preferentemente de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células adherentes derivadas del amnios por kilogramo del receptor para efectuar la inmunosupresión. En diversas realizaciones, una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios administrada a un individuo o sujeto comprende al menos, aproximadamente, o no más de,  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$  de células adherentes derivadas del amnios, o más.

Las células adherentes derivadas del amnios también se puede administrar con uno o más segundos tipos de células madre, por ejemplo, células madre mesenquimales de médula ósea o células madre de placenta según lo descrito en la patente de EE.UU. n.º 7.468.276 o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2007/0275362, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Dichas segundas células madre se pueden administrar a un individuo con células adherentes derivadas del amnios en una proporción de, por ejemplo, aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1.

Para facilitar la puesta en contacto, o la aproximación, de las células adherentes derivadas del amnios y las células inmunitarias *in vivo*, las células adherentes derivadas del amnios se pueden administrar al individuo por cualquier vía suficiente para poner las células adherentes derivadas del amnios y las células inmunitarias en contacto entre sí. Por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios se pueden administrar al individuo, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, parenteral, intratecal o directamente en un órgano, por ejemplo, el páncreas. Para la administración *in vivo*, las células adherentes derivadas del amnios se pueden formular como una composición farmacéutica, según lo descrito en el apartado 5.8.1, que se presenta más adelante.

El método de inmunosupresión puede comprender además la adición de uno o más agentes inmunosupresores, particularmente en el contexto *in vivo*. En una realización, la pluralidad de las células adherentes derivadas del amnios se pone en contacto con la pluralidad de células inmunitarias *in vivo* en un individuo, y se administra una composición que comprende un agente inmunosupresor al individuo. Los agentes inmunosupresores son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-receptor de linfocitos T (monoclonales o policlonales, o fragmentos de anticuerpos o derivados de los mismos), anticuerpos anti-receptor de IL-2 (por ejemplo, Basiliximab (SIMULECT<sup>®</sup>) o daclizumab (ZENAPAX<sup>®</sup>), anticuerpos anti-receptor de linfocitos T (por ejemplo, Muromonab-CD3), azatioprina, corticosteroides, ciclosporina, tacrolimus, micofenolato mofetilo, sirolimus, inhibidores de la calcineurina, y similares. En una realización específica, el agente inmunosupresor es un anticuerpo neutralizante contra la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  o MIP-1 $\beta$ . Preferentemente, el anticuerpo anti-MIP-1 $\alpha$  o anti-MIP-1 $\beta$  se administra en una cantidad suficiente para causar una reducción detectable en la cantidad de MIP-1 $\alpha$  o MIP-1 $\beta$  en dicho individuo.

Las células adherentes derivadas del amnios, además de la supresión de la proliferación de los linfocitos T, tienen otros efectos antiinflamatorios en las células inmunitarias que pueden ser beneficiosos en el tratamiento de, por ejemplo, una enfermedad inmunitaria, enfermedad de injerto contra hospedador, asma o alergias. Por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, cuando se administran a un individuo, reducen una respuesta inmunitaria mediada por un subconjunto de linfocitos T Th1 y/o Th17. En otro aspecto, en el presente documento, se proporciona un método de inhibición de una respuesta proinflamatoria, por ejemplo, una respuesta de Th1 o una respuesta de Th17, ya sea *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T o leucocitos CD4<sup>+</sup>) con células adherentes derivadas del amnios, es decir, con las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento. En una realización específica, dicha puesta en contacto reduce de forma detectable la maduración de los linfocitos Th1. En una realización específica del método, dicha puesta en contacto reduce de forma detectable la producción de uno o más de linfotóxina-1 $\alpha$  (LT-1 $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y/o interferón gamma (IFN $\gamma$ ) por dichos linfocitos T o por una célula productora de antígenos. En otra realización específica del método, dicha puesta en contacto potencia o regula positivamente un fenotipo regulador de los linfocitos T (Treg) y/o reduce la expresión en una célula dendrítica (DC) y/o macrófagos de biomoléculas que potencian una respuesta de Th1 y/o de Th17 (por ejemplo, CD80, CD83, CD86, ICAM-1, HLA-II). En una realización específica, dichos linfocitos T también se ponen en contacto con IL-10, por ejemplo, IL-10 exógena o IL-10 no producida por dichos linfocitos T, por ejemplo, IL-10 recombinante.

En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de reducción de la producción de citocinas proinflamatorias de macrófagos, que comprende poner en contacto los macrófagos con una cantidad eficaz de células adherentes derivadas del amnios. En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de aumento de un número de células tolerogénicas, de potenciación de las funciones tolerogénicas de células inmunitarias y/o de regulación positiva de citocinas tolerogénicas, por ejemplo, de macrófagos, que comprende poner en contacto células del sistema inmunitario con una cantidad eficaz de células adherentes derivadas del amnios. En una realización específica, dicha puesta en contacto hace que los macrófagos activados produzcan de forma detectable más IL-10 que los macrófagos activados que no están en contacto con dichas células adherentes derivadas del amnios. En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de regulación positiva o aumento del número de linfocitos T antiinflamatorios, que comprende poner en contacto células del sistema inmunitario con una cantidad eficaz de células adherentes derivadas del amnios.

En una realización, en el presente documento, se proporciona un método de inhibición de una respuesta de Th1 en un individuo que tiene o experimenta un síntoma de una enfermedad o afección relacionada con el sistema inmunitario, por ejemplo, una enfermedad inmunitaria, la enfermedad de injerto contra hospedador, asma o alergia, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de células adherentes derivadas del amnios, en el que dicha cantidad eficaz es una cantidad que produce una reducción detectable de una respuesta de Th1 en el individuo. En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de inhibición de una respuesta de Th17 en un individuo que tiene o experimenta un síntoma de una enfermedad o afección relacionada con el sistema inmunitario, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de células adherentes derivadas del amnios, en el que dicha cantidad eficaz es una cantidad que produce una reducción detectable de una respuesta de Th17 en el individuo. En realizaciones específicas de estos métodos, dicha administración reduce de manera detectable la producción, por parte de linfocitos T o células presentadoras de antígeno en dicho individuo, de una o más de IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, TNF $\alpha$  y/o IFN $\gamma$ . En otra realización específica del método, dicha puesta en contacto potencia o regula positivamente un fenotipo regulador de linfocitos T (Treg), o modula la producción en una célula dendrítica (DC) y/o macrófago de dicho individuo de marcadores de potencia una respuesta de Th1 o Th17. En otra realización específica, el método comprende, además, la administración de IL-10 a dicho individuo.

En otro aspecto, en el presente documento, se proporcionan células adherentes derivadas del amnios, como las descritas en el presente documento, que han sido diseñadas genéticamente para expresar una o más citocinas antiinflamatorias. En una realización específica, dichas citocinas antiinflamatorias comprenden IL-10.

## 5.2 MÉTODOS DE TRATAMIENTO QUE USAN CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

En el presente documento, se proporcionan métodos de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o un trastorno, en los que la enfermedad o el trastorno está causado por, o está asociado con, una respuesta inmunitaria inapropiada o no deseable, por ejemplo, una enfermedad, un trastorno o una afección que se puede tratar mediante inmunosupresión, que comprenden administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz (es decir, el número) de células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento. En una realización específica, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para suprimir de forma detectable una respuesta inmunitaria en el individuo. Dicha respuesta inmunitaria puede ser, por ejemplo, la proliferación de linfocitos T en un ensayo de MLR o de regresión usando linfocitos T del individuo. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de células adherentes derivadas del amnios, cuya administración produce una mejora detectable en, o la reducción de la progresión de, uno o más síntomas de la enfermedad o del trastorno.

Los individuos que tienen una enfermedad o un trastorno asociado con o causado por una respuesta inmunitaria inapropiada o no deseable se pueden tratar con una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios y, opcionalmente, con uno o más agentes terapéuticos, en cualquier momento durante la progresión de la enfermedad. En ciertas realizaciones, el individuo tiene, o está en riesgo de desarrollar, esclerosis múltiple; una enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; la enfermedad de injerto contra hospedador; artritis reumatoide; diabetes; soriasis; micosis fungoide; o una de las otras enfermedades o de los otros trastornos relacionados con el sistema inmunitario que se enumeran en el presente documento. Por ejemplo, el individuo se puede tratar inmediatamente después del diagnóstico, o a los 1, 2, 3, 4, 5, 6 días del diagnóstico, o a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años después del diagnóstico. El individuo se puede tratar de una vez o varias veces en el curso clínico de la enfermedad. El individuo se puede tratar, según sea apropiado, durante un ataque agudo, durante la remisión o durante una fase degenerativa crónica.

Las células adherentes derivadas del amnios que son útiles en el tratamiento de dicha enfermedad, dicho trastorno o dicha afección pueden ser cualquiera de las AMDAC desveladas en el presente documento. En una realización específica no limitante, las células adherentes derivadas del amnios expresan CD49f, CD105 y CD200, y no expresan OCT-4. En diversas realizaciones, las AMDAC administradas al individuo pueden comprender AMDAC definidas por, o caracterizables por, cualquiera de las combinaciones de proteínas o marcadores genéticos descritos en el presente documento.

En una realización, el método comprende administrar al individuo al menos una dosis de aproximadamente 300 millones de células adherentes derivadas del amnios. La dosis particular, sin embargo, puede variar de acuerdo con las características físicas del individuo, por ejemplo, el peso, y puede variar de 1 millón a 10 millones de AMDAC por dosis, preferentemente entre 10 millones y 1 billón de AMDAC por dosis, o entre 100 millones y 500 millones de AMDAC por dosis. La administración es preferentemente por vía intravenosa, pero puede ser por cualquier vía médicamente aceptable para la administración de células vivas, por ejemplo, parenteral, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, por punción lumbar, y similares. En una realización, las células adherentes derivadas del amnios proceden de un banco de células. En otra realización, una dosis de células adherentes derivadas del amnios está contenida dentro de una bolsa de sangre o bolsa similar, adecuada para la inyección en bolo o la administración por catéter.

En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o un trastorno, en el que la enfermedad o el trastorno está causado por, o está asociado con, una respuesta inmunitaria inapropiada o no deseable, por ejemplo, una enfermedad o un trastorno que se puede tratar beneficiosamente mediante inmunosupresión, que comprende administrar al individuo medio de cultivo que ha sido acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, en una cantidad suficiente para suprimir de forma detectable una respuesta inmunitaria en el individuo. Dicha respuesta inmunitaria puede ser, por ejemplo, la proliferación de linfocitos T en un ensayo de MLR, BTR o regresión realizado usando linfocitos T del individuo.

Las células adherentes derivadas del amnios o el medio acondicionado con las células adherentes derivadas del amnios se puede administrar en una sola dosis o en múltiples dosis. En ciertas realizaciones, por ejemplo, en las que las AMDAC se administran en múltiples dosis, las dosis pueden formar parte de un régimen terapéutico diseñado para aliviar, por ejemplo, uno o más síntomas agudos de una enfermedad o de un trastorno, en el que la enfermedad o el trastorno está causado por o está asociado con una respuesta inmunitaria inapropiada o no deseable. En otras ciertas realizaciones, por ejemplo, en las que las AMDAC se administran en múltiples dosis, las dosis pueden formar parte de un régimen terapéutico a largo plazo diseñado para evitar o reducir la gravedad de un curso crónico de dicha enfermedad o dicho trastorno.

#### **5.2.1 Tratamiento de la esclerosis múltiple**

En otro aspecto, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene esclerosis múltiple o un síntoma asociado con la esclerosis múltiple, que comprende administrar al individuo una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios o medio acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para modular de forma detectable, por ejemplo, suprimir una respuesta inmunitaria en el individuo.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria recurrente, crónica, del sistema nervioso central. Dicha enfermedad provoca lesiones en las vainas de mielina que rodean el SNC y los axones SNP, los oligodendrocitos y las propias células nerviosas. La enfermedad está mediada por los linfocitos T autorreactivos, particularmente los linfocitos T CD4+, que proliferan, atraviesan la barrera hematoencefálica y entran en el SNC bajo la influencia de las moléculas de adhesión celular y citocinas proinflamatorias. Los síntomas de la EM incluyen alteraciones sensoriales en las extremidades, disfunción del nervio óptico, disfunción del tracto piramidal, disfunción de la vejiga, disfunción intestinal, disfunción sexual, ataxia y diplopía.

Se han identificado cuatro tipos o cursos clínicos diferentes de la EM. El primero, la EM recidivante/remitente (EMRR) se caracteriza por ataques autolimitantes de disfunción neurológica que se manifiestan de forma aguda en el transcurso de días a semanas, seguidos de un período de recuperación, a veces incompleta, durante varios meses. El segundo tipo, la EM secundaria progresiva (EMSP), comienza como la EMRR, pero cambia de modo que el curso clínico pasa a caracterizarse por un deterioro constante de la función no relacionada con los ataques agudos. La tercera, la EM progresiva primaria (EMPP), se caracteriza por una reducción constante en función de la aparición, sin ataques agudos. El cuarto tipo, la EM progresiva/recidivante (EMPR), también comienza con un curso progresivo, con ataques ocasionales superpuestos a la reducción progresiva de la función.

En general, las personas que tienen EM se evalúan usando una evaluación de las habilidades motoras, opcionalmente, con una MRI. Por ejemplo, una evaluación de las habilidades motoras, la escala del estado de discapacidad expandida, gradaciones de las puntuaciones de las capacidades del individuo afectado, de la siguiente manera

0.0 Examen neurológico normal.

1.0 Sin discapacidad, signos mínimos en un SF.

1.5 Sin discapacidad, signos mínimos en más de un SF.

2.0 Discapacidad mínima en un SF.

2.5 Discapacidad leve en un SF o discapacidad mínima en dos SF.

- 3.0 Discapacidad moderada en un SF, o discapacidad leve en tres o cuatro SF. Totalmente ambulatoria.
- 3.5 Totalmente ambulatoria, pero con discapacidad moderada en un SF y discapacidad superior a la mínima en otros varios.
- 5 4.0 Totalmente ambulatoria sin ayuda, autosuficiente, y hasta y aproximadamente unas 12 horas al día a pesar de la discapacidad relativamente grave; capaz de caminar sin ayuda ni descanso unos 500 metros.
- 4.5 Totalmente ambulatoria sin ayuda, hasta y aproximadamente gran parte del día, capaz de trabajar un día completo, o puede tener alguna limitación de la actividad total o requerir un mínimo de ayuda; caracterizado por discapacidad relativamente grave; capaz de caminar sin ayuda ni descanso unos 300 metros.
- 10 5.0 Ambulatoria sin ayuda ni descanso durante unos 200 metros; discapacidad lo suficientemente grave como para afectar a las actividades diarias completas (trabajar un día completo sin disposiciones especiales).
- 5.5 Ambulatoria sin ayuda ni descanso durante unos 100 metros; discapacidad lo suficientemente grave como para impedir las actividades diarias completas.
- 6.0 Ayuda intermitente o unilateral constante (bastón, muleta, dispositivo ortopédico) necesaria para caminar unos 100 metros con o sin descanso.
- 15 6.5 Ayuda bilateral constante (bastones, muletas, aparatos ortopédicos) necesaria para caminar unos 20 metros sin descansar.
- 7.0 Imposibilidad de caminar más de aproximadamente cinco metros, incluso con ayuda, esencialmente limitado a una silla de ruedas; capaz de manejarse solo con la silla de ruedas convencional y de sentarse por sí solo; silla de ruedas hasta y aproximadamente 12 horas al día.
- 20 7.5 Imposibilidad de dar más de unos cuantos pasos; limitado a una silla de ruedas; puede necesitar ayuda para sentarse en la silla; la maneja solo, pero no puede permanecer en una silla de ruedas convencional durante todo el día; puede requerir silla de ruedas motorizada.
- 8.0 Esencialmente limitado a una cama o silla o deambulado en silla de ruedas, pero puede estar fuera de la cama gran parte del día; conserva muchas de las funciones de cuidado personal; en general, usa de manera eficaz los brazos.
- 25 8.5 Esencialmente limitado a una cama gran parte del día; usa con cierta eficacia los brazos y conserva algunas funciones de cuidado personal.
- 9.0 Confinado a la cama; todavía puede comunicarse y comer.
- 9.5 Paciente totalmente imposibilitado en la cama; incapaz de comunicarse de manera eficaz o comer/tragar.
- 30 1.0 Fallecimiento debido a la EM.

En el sistema de puntuación anterior, "SF" se refiere a los ocho sistemas funcionales según lo medidos, incluyendo el sistema piramidal, del cerebelo, del tronco cerebral, sensorial, intestinal y de la vejiga, visual, cerebral, y otros sistemas.

35 Se conocen otros sistemas de puntuación similares, que incluyen la escala de puntuación neurológica de Scripps, el índice ambulatorio y la puntuación compuesta funcional de la esclerosis múltiple (MSFC). El progreso de la EM también se ha evaluado mediante la determinación de la velocidad del ataque. El progreso de la EM también se ha evaluado mediante la generación de imágenes por resonancia magnética, que puede detectar lesiones neuronales asociadas con la EM (por ejemplo, nuevas lesiones, aumento de lesiones o lesiones activas únicas combinadas).

40 Por lo tanto, en una realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene EM, por ejemplo, un individuo que ha sido diagnosticado de EM, que comprende administrar al individuo una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios, que son suficientes para suprimir de forma detectable una respuesta inmunitaria en el individuo. En una realización específica, la EM es EM recidivante/remitente. En otra realización específica, la EM es EM secundaria progresiva. En otra realización específica, la EM es EM progresiva primaria. En otra realización específica, la EM es EM progresiva/recidivante. En otra realización específica, la administración mejora de manera detectable uno o más síntomas de la EM en el individuo. En realizaciones más específicas, el síntoma es, por ejemplo, uno o más de un trastorno sensorial en las extremidades, una disfunción del nervio óptico, una disfunción del tracto piramidal, una disfunción de la vejiga, una disfunción del intestino, una disfunción sexual, ataxia o diplopía. En otra realización específica, dicha administración da lugar a una mejora en la escala EDSS de al menos medio punto. En otra realización específica, dicha administración da lugar al mantenimiento de la función, de acuerdo con al menos un sistema de puntuación de la EM, en el transcurso de, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 meses. En otra realización específica, dicha administración da lugar a una mejora en la escala EDSS de al menos un punto. En otra realización específica, dicha administración da lugar a una

mejora en la escala EDSS de al menos dos puntos. En otras realizaciones específicas, dicha administración da lugar a una mejora detectable en una escala de evaluación de la esclerosis múltiple o en una MRI. El individuo se puede tratar, según proceda, durante un ataque agudo, durante la remisión o durante una fase degenerativa crónica. En otra realización, las AMDAC se administran a una mujer que tiene EM, después de un parto, para mantener el estado de remisión o reducir la aparición de recaídas experimentada durante el embarazo.

En el presente documento, también se proporcionan métodos para el tratamiento de un individuo que tiene EM, por ejemplo, un individuo que ha sido diagnosticado de EM, que comprende administrar al individuo una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios suficientes para suprimir de forma detectable una respuesta inmunitaria en el individuo, en el que la administración mejora de manera detectable uno o más síntomas de la EM en el individuo, y, además, uno o más segundos agentes terapéuticos. En una realización, el segundo agente terapéutico es uno o más de entre Rituximab, Alemtuzumab, Cladribina, Daclizumab, Natalizumab, Tysabri o monociclina (minociclina). En otras realizaciones, el segundo agente terapéutico es un glucocorticoide. En realizaciones específicas, el glucocorticoide es la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), metilprednisolona o dexametasona. En otra realización, el segundo agente terapéutico es un agente inmunomodulador o inmunosupresor. En diversas realizaciones específicas, el agente inmunomodulador o inmunosupresor es IFN $\beta$ -1a, IFN-1b, acetato de gliatramer, ciclofosfamida, metotrexato, azatioprina, cladribina, ciclosporina o mitoxantrona. En otras realizaciones, el agente terapéutico es inmunoglobulina intravenosa, intercambio de plasma o sulfasalazina. En otra realización, el individuo recibe cualquier combinación de los segundos agentes terapéuticos anteriores, además de las AMDAC.

### 5.2.2 Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal

En otro aspecto, se usan células adherentes derivadas del amnios para el tratamiento de un individuo que tiene o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria intestinal (EII), por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. Por lo tanto, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene la enfermedad inflamatoria intestinal, o un síntoma asociado con la enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende administrar al individuo una pluralidad de células adherentes derivadas del amnios, o medio acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para modular de forma detectable, por ejemplo, suprimir una respuesta inmunitaria en el individuo.

*Enfermedad de Crohn.* En una realización, la EII es la enfermedad de Crohn, a veces denominada ileítis o enteritis. La enfermedad de Crohn es una enfermedad crónica que provoca la inflamación del tracto digestivo (también conocido como tracto gastrointestinal o GI). La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tracto GI, desde la boca al ano, pero más comúnmente afecta a la parte inferior del intestino delgado, que se denomina íleon. Se conocen cinco tipos de enfermedad de Crohn. La enfermedad de Crohn gastroduodenal afecta al estómago y al duodeno (la parte más alta del intestino delgado). La yeyunoileítis es la enfermedad de Crohn del yeyuno, la parte más larga del intestino delgado. La ileítis es la enfermedad de Crohn del íleon, la parte inferior del intestino delgado. La ileocolitis, la forma más común de enfermedad de Crohn, afecta al íleon y al colon. Finalmente, la colitis de Crohn (granulomatosa colitis) afecta al colon, y se distingue de la colitis ulcerosa en que, en la colitis de Crohn, suele haber zonas de tejido sano entre las zonas de tejido enfermo, y la colitis de Crohn puede afectar solo al colon, sin la participación del recto. Se cree que la enfermedad de Crohn deriva de la reacción inapropiada del sistema inmunitario del organismo hacia los antígenos en el tracto GI, incluyendo, por ejemplo, alimentos, bacterias beneficiosas, etc., lo que da lugar a una acumulación de glóbulos blancos en el revestimiento de los intestinos. La inflamación asociada con la enfermedad de Crohn también se ha atribuido a la acción del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) de las citocinas.

*Colitis ulcerosa.* En otra realización, la EII es la colitis ulcerosa. La colitis ulcerosa es una enfermedad que causa inflamación y llagas (úlceras) en el revestimiento del recto y/o del colon. Las úlceras se forman donde la inflamación ha causado la muerte de las células que normalmente recubren el colon; las úlceras, por lo general, posteriormente sangran y producen pus. Cuando se produce la inflamación en el recto y en la parte inferior del colon, la enfermedad se conoce como proctitis ulcerosa. Si afecta a todo el colon, la enfermedad se denomina pancolitis. Si se ve afectado solo el lado izquierdo del colon, la enfermedad se denomina colitis limitada o distal. Los síntomas de la colitis ulcerosa incluyen, pero sin limitación, dolor abdominal, diarrea con sangre, fiebre, náuseas, calambres abdominales, anemia, fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, hemorragia rectal, pérdida de líquidos y nutrientes corporales, lesiones de la piel, dolor de articulaciones y falta de crecimiento (en niños). La colitis ulcerosa también puede causar complicaciones tales como inflamación ocular, enfermedad hepática y osteoporosis.

Por lo tanto, en una realización, en el presente documento se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios a dicho individuo, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que produce una mejora detectable en al menos un síntoma de dicha enfermedad inflamatoria intestinal (EII). En una realización específica, la EII es la enfermedad de Crohn. En una realización más específica, dicha enfermedad de Crohn es la enfermedad de Crohn gastroduodenal, yeyunoileítis, ileítis, ileocolitis o colitis de Crohn. En otra realización específica, la enfermedad de Crohn se enfermedad de Crohn fistulizante. En otra realización más específica, dicho síntoma es un síntoma de la enfermedad de Crohn. En una realización más específica, dicho síntoma de la enfermedad de Crohn es inflamación e hinchazón de una parte del tracto GI, dolor abdominal, vaciado frecuente del intestino y/o diarrea. En otra realización más específica, dicho síntoma de la



enfermedad de Crohn es sangrado rectal, anemia, pérdida de peso, artritis, problemas cutáneos, fiebre, engrosamiento de la pared intestinal, formación de tejido cicatricial en los intestinos, formación de llagas o úlceras en el intestino, desarrollo de una o más fístulas en la pared intestinal, desarrollo de una o más fisuras en el ano, desarrollo de deficiencias nutricionales (por ejemplo, deficiencias en una o más de entre proteínas, calorías, vitaminas), desarrollo de cálculos renales, desarrollo de cálculos biliares, o enfermedades del hígado o del sistema biliar.

En otra realización más específica, la EII es la colitis ulcerosa. En una realización más específica, dicha colitis ulcerosa es proctitis ulcerosa, pancolitis, colitis limitada o colitis distal. En otra realización más específica, dicho síntoma es un síntoma de la colitis ulcerosa. En una realización más específica, dicho síntoma es dolor abdominal, diarrea con sangre, fiebre, náuseas, calambres abdominales, anemia, fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, sangrado rectal, pérdida de líquidos corporales y nutrientes, lesiones cutáneas, dolor en las articulaciones y falta de crecimiento. En otra realización más específica, el síntoma es osteoporosis, inflamación ocular o enfermedad hepática.

En ciertas realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios están diseñadas genéticamente para expresar una o más proteínas terapéuticas. En realizaciones específicas, dichas una o más proteínas terapéuticas son IL-10, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y/o factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

En otra realización específica, dicho individuo a quien se administran células adherentes derivadas del amnios, recibe además uno o más de un segundo agente terapéutico, comprendiendo dicho segundo agente terapéutico, por ejemplo, un agente antiinflamatorio, un esteroide, inmunosupresor y/o un antibiótico. Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios útiles en el tratamiento de, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa incluyen, pero sin limitación, mesalamina, agentes 5-ASA (ácido 5-aminosalicílico) (por ejemplo, ASACOL® (mesalamina, de liberación retardada), DIPENTUM (Osalazine), PENTASA® (mesalamina de liberación controlada)), sulfasalazina (una combinación de 5-ASA y sulfapiridina), anticuerpos antiinflamatorios (por ejemplo, Infliximab (REMICADE®)), y similares. Los ejemplos de esteroides útiles en el tratamiento de la enfermedad de Crohn o de la colitis ulcerosa incluyen, pero sin limitación, cortisona, hidrocortisona, prednisona, metilprednisolona, y similares. Por lo general, como se practica en la técnica, la dosis de esteroides se administra primero en una dosis relativamente alta, seguida de dosis menores a medida que disminuye la inflamación. Los ejemplos de supresores inmunes útiles en el tratamiento de la enfermedad de Crohn incluyen, pero sin limitación, ciclosporina A, 6-mercaptopurina o azatioprina. Se puede usar cualquier antibiótico en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, incluyendo, por ejemplo, ampicilina, sulfonamida, cefalosporina, tetraciclina y/o metronidazol. En otra realización específica, el segundo tratamiento es una administración de tricocéfalos porcinos, por ejemplo, óvulos de *Trichuris suis*. En otras realizaciones específicas, el segundo tratamiento es uno o más de un inhibidor de TNF $\alpha$  (por ejemplo, Infliximab, Adalimumab, Certolizumab), un inhibidor de IL-6 (por ejemplo, Atilizumab), un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha 4$  (por ejemplo, Natalizumab), un inhibidor de interferón gamma (por ejemplo, Fonolizumab), un anticuerpo que se une a los linfocitos T CD4+ y a subconjuntos de linfocitos T auxiliares Th2 (por ejemplo, Visilizumab), Alicaforfen (un inhibidor antisentido de ICAM-1), un anticuerpo anti-IL-12Ab, un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (por ejemplo, MLN02, un anticuerpo producido en el laboratorio) y/o GM-CSF recombinante (por ejemplo, Sargramostim, LEUKINE®).

En ciertas realizaciones, el individuo que tiene la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, no es refractario a ninguna otra terapia para el tratamiento de la EII. En otra realización, el individuo que tiene la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, es refractario al menos a otra terapia para el tratamiento de la EII. En una realización específica, el individuo refractario a al menos otra terapia para el tratamiento de la EII, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, es refractario a la terapia con esteroides, por ejemplo, la terapia con corticosteroides.

En ciertas realizaciones, la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, se asocia con o está causada en parte por un aumento detectable del número de células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos y/o macrófagos activados. En realizaciones específicas, los linfocitos activados son linfocitos T Th17 y/o Th1. En otras ciertas realizaciones, la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, se asocia con o está causada en parte por un aumento detectable de la concentración en suero sanguíneo de la IL-2, IL-12, IL-23, TNF $\alpha$  y/o IFN $\gamma$ . Como tal, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, que comprende (1) determinar un número de linfocitos T, linfocitos y/o macrófagos activados en dicho individuo; y (2) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios (es decir, un número de células), según lo descrito en el presente documento, al individuo, siendo dicha cantidad terapéuticamente eficaz una cantidad que reduzca de forma detectable la cantidad de linfocitos T, linfocitos y/o macrófagos activados en dicho individuo, en comparación con la situación previa a dicha administración. En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, que comprende (1) determinar la concentración de IL-2, IL-12, IL-23, TNF $\alpha$  y/o IFN $\gamma$  de un tejido, por ejemplo, sangre o suero, de dicho individuo; y (2) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz (es decir, un número de células) de células adherentes derivadas del amnios, según lo descrito en el presente documento, al individuo, en el que dicha

cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que reduce de forma detectable la concentración de IL-2, IL-12, IL-23, TNF $\alpha$  y/o IFN $\gamma$  en dicho tejido de dicho individuo, en comparación con una situación previa a dicha administración. En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, enfermedad de Crohn, que comprende (1) determinar una cantidad de IL-2, IL-12, IL-23, TNF $\alpha$  y/o IFN $\gamma$  producida por los linfocitos T, linfocitos, células productoras de antígeno y/o macrófagos; y (2) administrar una cantidad eficaz de células adherentes derivadas del amnios, según lo descrito en el presente documento, al individuo, siendo dicha cantidad eficaz una cantidad que reduce de forma detectable una cantidad de IL-2, IL-12, IL-23, TNF $\alpha$  y/o IFN $\gamma$  producida por los linfocitos T, linfocitos, células productoras de antígeno y/o macrófagos en dicho individuo, en comparación con una situación previa a dicha administración. En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, enfermedad de Crohn, que comprende (1) determinar un número de linfocitos T Th1 y/o Th17 de una muestra de dicho individuo; y (2) administrar una cantidad eficaz de células adherentes derivadas del amnios, según lo descrito en el presente documento, al individuo, siendo dicha cantidad eficaz una cantidad que reduce de forma detectable la cantidad de linfocitos T Th1 y/o Th17 en comparación con el número previo a dicha administración.

En otras ciertas realizaciones, en las que la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa, la enfermedad se caracteriza predominantemente por linfocitos y neutrófilos activados, y el subconjunto de linfocitos T activados es Th17 (IL-23) y Th2 (IL-4, IL-5 y IL-13). Por lo tanto, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene colitis ulcerosa, que comprende (1) determinar la concentración de IL-4, IL-5, IL-13 y/o IL-23 en un tejido, por ejemplo, suero, de dicho individuo; y (2) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios, según lo descrito en el presente documento, al individuo, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que reduce de forma detectable la concentración de IL-23 en dicho tejido de dicho individuo, en comparación con una situación previa a dicha administración.

La administración de AMDAC para el tratamiento de la EII, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, puede ser por cualquier vía médicamente aceptable descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, en las que la EII se la enfermedad de Crohn fistulizante, las AMDAC pueden administrarse localmente, por ejemplo, directamente en o adyacentes a una o más fistulas.

### **5.2.3 Tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador**

En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo, por ejemplo, un receptor de un trasplante o un individuo que va a recibir un trasplante que tiene o está experimentando un síntoma de, o está en riesgo de desarrollar, la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios (es decir, un número de células) o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una mejora detectable en uno o más síntomas de la GVHD, o suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la GVHD.

La GVHD normalmente se desarrolla tras el trasplante, o como resultado del trasplante, de tejido total o parcialmente alogénico, especialmente tras el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, y puede incluir el desarrollo de una o más de dermatitis, enteritis y hepatitis normalmente a los 5-100 días del trasplante. La GVHD puede ser aguda o crónica. La GVHD aguda se puede caracterizar por la aparición de una erupción pruriginosa o dolorosa, por lo general, a los 5 a 47 después del trasplante. La GVHD hiperaguda también puede ir acompañada de fiebre, eritrodermia generalizada y descamación. El hígado también puede participar, como lo demuestran niveles elevados (por ejemplo, más altos de lo normal) de bilirrubina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (AP). La GVHD aguda también puede afectar al colon, lo que resulta en diarrea, hemorragias internas, calambres, dolor abdominal e íleo. La GVHD crónica puede ocurrir en pacientes trasplantados que han experimentado la GVHD aguda, o que antes eran asintomáticos. Las manifestaciones de la GVHD crónica incluyen una sensación de ardor en los ojos, irritación ocular, fotofobia y dolor en los ojos debido a la reducción de la secreción lagrimal; sequedad de la boca, sensibilidad a los alimentos picantes o ácidos, dolor abdominal, disfagia (dificultad para tragar), odinofagia (dolor al tragar), pérdida de peso, enfermedad pulmonar obstructiva, debilidad muscular, dolor neuropático y/o calambres musculares.

Por lo tanto, en realizaciones específicas del método, la cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios es una cantidad suficiente para causar una mejora detectable en uno o más síntomas de la GVHD aguda o suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la GVHD aguda. En realizaciones más específicas, dichos uno o más síntomas comprenden dermatitis, piel pruriginosa, erupción cutánea, enteritis, hepatitis, fiebre, eritrodermia, descamación, un nivel elevado del ALT, un nivel elevado del AST, un nivel elevado del AP; un nivel elevado de bilirrubina; dolor abdominal, calambres, sangrado interno o íleo. En otra realización específica del método, la cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios es una cantidad suficiente para causar una mejora detectable en uno o más síntomas de la GVHD crónica o suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la GVHD crónica, donde dichos uno o más síntomas incluyen una sensación de ardor en los ojos, irritación de los ojos, reducción de la producción de lágrimas, fotofobia, dolor ocular debido a la reducción de la secreción lagrimal, sequedad de la boca, sensibilidad

5 hacia los alimentos picantes o ácidos, dolor abdominal, disfagia (dificultad para tragar), odinofagia (dolor al tragar), pérdida de peso, enfermedad pulmonar obstructiva (incluyendo cualquiera de disnea con sibilancias y/o tos crónica), debilidad muscular, dolor neuropático y/o calambres musculares. En otras realizaciones específicas del método, los síntomas de la GVHD aguda y/o la GVHD crónica comprenden hiperbilirrubinemia, ictericia, hipertensión portal, cirrosis, conjuntivitis hemorrágica, formación de pseudomembranas, lagofthalmos, queratoconjuntivitis crónica, sicca, queratopatía con marcas, atrofia de la mucosa oral, eritema, desarrollo de las lesiones liquenoides de la mucosa bucal o labial, bronquiolitis obliterante, vaginitis, estenosis vaginal, trombocitopenia autoinmune y/o anemia.

10 El método no está limitado por la naturaleza del donante ni del receptor. El trasplante puede cruzar líneas de especies. En realizaciones preferidas, el donante y el receptor son de la misma especie, por ejemplo, ambos son seres humanos. El receptor del trasplante puede ser total o parcialmente alogénico al donante. El trasplante puede ser autólogo. Los receptores o donantes de trasplantes pueden tener menos de cinco años de edad, de 1 a 10 años de edad, de 5 a 15 años de edad, de 10 a 20 años de edad, de 15 a 25 años de edad, de 20 a 30 años de edad, de 25 a 35 años de edad, de 30 a 40 años de edad, de 35 a 45 años de edad, de 40 a 50 años de edad, de 45 a 55 años de edad, de 50 a 60 años de edad, de 55 a 65 años de edad, de 60 a 70 años de edad o 70 años de edad o más.

15 La GVHD, en general, se califica por la gravedad de los síntomas. Por ejemplo, en una realización, los síntomas de la GVHD se dividen en fases y la GVHD se clasifica de 0 (sin GVHD) a IV (GVHD potencialmente mortal) de acuerdo con los síntomas en la piel, el hígado y/o el intestino, como se muestra en las Tablas 1 y 2:

Tabla 1. Determinación de la fase de la enfermedad de injerto contra hospedador aguda

Fase	Piel	Hígado (nivel de bilirrubina, mg/ml)	Intestino
+	Sarpullido maculopapular en < 25 % de la superficie corporal	2-3	Diarrea de 500-1.000 ml/d o náuseas permanentes
++	Sarpullido maculopapular en 25-50 % de la superficie corporal	3-6	Diarrea de 1.000-1.500 ml/d
+++	Eritrodermia generalizada	6-15	Diarrea > 1.500 ml/d
++++	Descamación y bulas	>15	Dolor con o sin íleo

20

Tabla 2. Clasificación de la GVHD aguda

Grado general	Estado			
	piel	hígado	intestino	Deficiencia funcional
0 (ninguna)	0	0	0	0
I (leve)	de + a ++	0	0	0
II (moderada)	de + a +++	+	+	+
III (grave)	de ++ a +++	de ++ a +++	de ++ a +++	++
IV (potencialmente mortal)	de ++ a ++++	de ++ a ++++	de ++ a ++++	+++

25 Por lo tanto, en otra realización del método, la cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios es una cantidad suficiente para producir una mejora en uno o más síntomas de la enfermedad de injerto contra hospedador, por ejemplo, en un individuo, por ejemplo, un individuo que ha recibido un trasplante (receptor del trasplante), de manera que dicha enfermedad de injerto contra hospedador se reduce de grado en al menos una etapa. En realizaciones específicas, dicha enfermedad de injerto contra hospedador se reduce del grado IV al grado III; del grado IV al grado II; del grado IV al grado I; del grado IV al grado 0; del grado III al grado II; del grado III al grado I; del grado III al grado 0; del grado II al grado I; del grado II al grado 0; o del grado I al grado 0. En otra

30 realización del método, la cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios es una cantidad que hace que la enfermedad de injerto contra hospedador de dicho individuo no desarrolle a más del grado 0, grado I, grado II o grado II a los 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 días después del trasplante.

35 En diversas realizaciones específicas, el individuo que tiene o que está en riesgo de desarrollar la GVHD son individuos que reciben trasplantes alogénicos de células hematopoyéticas (por ejemplo, individuos que no reciben profilaxis para la GVHD, individuos de mayor edad; receptores de células madre hematopoyéticas no HLA idénticos; receptores de injertos de donantes alosensibilizados; receptores de injertos de donantes no relacionados); individuos que reciben trasplantes de órganos sólidos, en particular, trasplantes de órganos que comprenden tejido linfoide, por ejemplo, trasplantes intestinales de pequeño tamaño; e individuos que reciben productos sanguíneos irradiados (por ejemplo, recién nacidos y fetos, individuos que tienen síndromes de inmunodeficiencia congénita, individuos que

40 reciben quimioterapia inmunosupresora, individuos que reciben donaciones de sangre dirigidas de donantes HLA parcialmente idénticos, HLA homólogos), individuos que reciben aloinjertos de tejido compuesto (es decir, aloinjertos

que tienen más de un tipo de tejido); y similares. La GVHD también puede ocurrir tras un trasplante autólogo o singénico de células hematopoyéticas. En otra realización específica, el individuo ha recibido radiación (por ejemplo, ha sido irradiado) a una dosis subletal o letal como un complemento del trasplante.

5 En realizaciones específicas, las células adherentes derivadas del amnios se administran al individuo 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día antes del trasplante, por ejemplo, del tejido que causa o inicia la enfermedad de injerto contra hospedador. En otra realización específica, las células adherentes derivadas del amnios se administran simultáneamente con el trasplante. En otra realización específica, las células adherentes derivadas del amnios se administran a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días del trasplante. La administración de las células adherentes derivadas del amnios se puede realizar varias veces, por ejemplo, varias veces antes, con o después del trasplante, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios se administran en cualquier momento después del trasplante, cuando la enfermedad de injerto contra hospedador de grado II o peor se manifiesta en el individuo (receptor del trasplante).

15 En otra realización del método, el individuo, por ejemplo, receptor del trasplante o individuo que va a recibir un trasplante, recibe células adherentes derivadas del amnios y, además, uno o más segundos agentes terapéuticos. En una realización específica, el agente terapéutico es globulina atimocítica, micofenolato mofetilo, sirolimus, Campath-1H, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), ácido suberoilánilida-hidroxámico (SAHA), cortisona, hidrocortisona, prednisona o metilprednisolona. En otra realización específica, el agente terapéutico es un agente inmunomodulador o un agente inmunosupresor. Los agentes inmunosupresores y agentes inmunomoduladores aplicables a la GVHD son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A, antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), moduladores de receptores de linfocitos T y moduladores de receptores de citocinas, miméticos de péptidos y anticuerpos (por ejemplo, fragmentos humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, Fvs, ScFvs, Fab o F(ab)<sub>2</sub> o fragmentos de unión a epitopos), moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico antisentido y hélices triples), moléculas pequeñas, compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos. En particular, los agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin limitación, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxano, Immuran, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), moduladores de receptores de linfocitos T y moduladores de receptores de citocinas. Los ejemplos de moduladores de receptores de linfocitos T incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti-receptores de linfocitos T (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 (por ejemplo, cM-T412 (Boeringer), IDEC-CE9.1s (IDEC y SKB), mAB 4162W94, ORTHOCLONE<sup>®</sup> y OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticuerpos anti-CD3 (por ejemplo, NUVION<sup>®</sup> (Product Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson) o Rituxan (IDEC)), anticuerpos anti-CD5 (por ejemplo, un inmunoconjugado ligado a ricina anti-CD5), anticuerpos anti-CD7 (por ejemplo, CHH-380 (Novartis)), anticuerpos anti-CD8, anticuerpos monoclonales de ligando anti-CD40 (por ejemplo, IDEC-131 (IDEC)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH<sup>®</sup> 1H (Ilex)), anticuerpos anti-CD2, anticuerpos anti-CD1a (por ejemplo, Xanelim (Genentech)) y anticuerpos anti-B7 (por ejemplo, IDEC-114 ) (IDEC))), CTLA4-inmunoglobulina, talidomida o uno de los compuestos del apartado 5.6.6, anterior. En una realización específica, un modulador de los receptores de linfocitos T es un antagonista de CD2. En otras realizaciones, un modulador de los receptores de linfocitos T no es un antagonista de CD2. En otra realización específica, el agente es un anticuerpo MEDI-501 (T10B9). En otra realización específica, un modulador de los receptores de linfocitos T es una molécula de unión a CD2, preferentemente, MEDI-507. En otras realizaciones, un modulador de los receptores de linfocitos T no es una molécula de unión a CD2. Se puede administrar cualquier combinación de los agentes terapéuticos anteriores, adecuados para el tratamiento de la GVHD o un síntoma de la GVH. Dichos agentes terapéuticos pueden administrarse en cualquier combinación con las células adherentes derivadas del amnios, al mismo tiempo o como un curso separado de tratamiento.

#### **5.2.4 Tratamiento de la artritis reumatoide**

50 En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene o está experimentando un síntoma de, o está en riesgo de desarrollar, artritis reumatoide (AR), que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios (es decir, un número de células) o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para producir una mejora detectable en uno o más síntomas de la AR, o suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la AR. La artritis reumatoide es una afección inmunitaria inflamatoria, crónica, en la que el sistema inmunológico del organismo ataca a las articulaciones y, normalmente, a otros tejidos del organismo.

60 En una realización específica, la administración es suficiente para producir una mejora detectable de uno o más síntomas de la AR, o es suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la AR, en al menos una articulación del individuo con AR. En otra realización específica, la administración es suficiente para producir una mejora detectable en uno o más síntomas de la AR, o suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la AR, en al menos un tejido no articular del individuo con AR. Los ejemplos de tejido no articular que pueden ser afectados por la AR incluyen, pero sin limitación, la piel (dermis), los pulmones, el sistema autoinmune o la sangre, tejido renal, tejido cardiovascular, tejido ocular o tejido neurológico.

En realizaciones específicas, el síntoma de la AR es, sin limitación, rigidez matutina (por ejemplo, de más de una hora de duración), hinchazón de los tejidos blandos de una o más articulaciones o grupos articulares, dolor de las articulaciones, nódulos subcutáneos, factor reumatoide presente por encima del percentil 95 o cambios radiológicos que sugieren erosión articular.

5 En una realización específica, la administración es suficiente para producir una mejora detectable en una o más afecciones que complementan la AR, o suficiente para reducir de forma detectable la aparición de una o más afecciones que complementan la AR. Los ejemplos de dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, pioderma gangrenoso, dermatosis neutrofilica, síndrome de Sweet, infección viral, eritema nodoso, paniculitis lobular, atrofia de la piel digital, eritema palmar, adelgazamiento difuso (piel de papel de arroz), fragilidad de la piel, nódulos subcutáneos en una superficie exterior, por ejemplo, en los codos, fibrosis pulmonar (por ejemplo, como consecuencia del tratamiento con metotrexato), nódulos de Caplan, trastornos de vasculitis, infartos con plegamiento de uñas, neuropatía, nefropatía, amiloidosis, seudohipertrofia muscular, endocarditis, insuficiencia del ventrículo izquierdo, valulitis, escleromalacia, mononeuritis múltiple, subluxación atlanto-axial, y similares.

15 En otra realización del método, el individuo que tiene AR recibe células adherentes derivadas del amnios y, además, al menos otro agente terapéutico. En realizaciones específicas, el agente terapéutico es, por ejemplo, un analgésico, o un agente antiinflamatorio. En otra realización específica, el agente terapéutico es un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD). En una realización más específica, el DMARD es uno o más de un xenobiótico (por ejemplo, azatioprina, ciclosporina A, D-penicilamina, sales de oro, hidroxicloroquina, leflunomida, metotrexato, minociclina o sulfasalazina) o un agente biológico (por ejemplo, bloqueadores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), tales como etanercept (ENBREL<sup>®</sup>), infliximab (REMICADE<sup>®</sup>), adalimumab (HUMIRA<sup>®</sup>) o uno de los compuestos desvelados en el apartado 5.6.8, anterior; bloqueadores de la interleucina-1; anticuerpo anti-linfocitos B (CD20) (por ejemplo, rituximab o Rituxan<sup>®</sup>) o bloqueadores de la activación de los linfocitos T (por ejemplo, abatacept o ORENCIA<sup>®</sup>). En otra realización más específica, el analgésico o agente antiinflamatorio es un glucocorticoide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, acetaminofeno, ibuprofeno, aspirina, un opiáceo o lidocaína (tópica). Se puede administrar a cualquier combinación de los agentes terapéuticos anteriores, adecuados para el tratamiento de la GVHD o de un síntoma de la GVHD. Dichos agentes terapéuticos se pueden administrar en cualquier combinación con las células adherentes derivadas del amnios, al mismo tiempo o como un curso separado de tratamiento.

30 En una realización específica, una pluralidad de las células adherentes derivadas del amnios administradas a un individuo que tiene AR ha sido diseñada genéticamente para expresar un polipéptido terapéutico para la AR. En una realización más específica, el polipéptido terapéutico para la AR es IL-1Ra (antagonista de los receptores de la interleucina-1). En otra realización más específica, el polipéptido terapéutico para la AR es una proteína de fusión que comprende IL-1Ra y DHFR (dihidrolato reductasa). En una realización más específica, las células adherentes derivadas del amnios se transforman con un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión IL-1Ra-DHFR, en la que la expresión de la proteína de fusión se ve reforzada por un antifolato, por ejemplo, metotrexato. En otra realización específica, se administra además una pluralidad de un segundo tipo de células madre al individuo que tiene AR, en la que el segundo tipo de células madre, o al menos una pluralidad del segundo tipo de células madre, han sido diseñado genéticamente para expresar un polipéptido terapéutico para la AR, por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos desvelados anteriormente. En una realización todavía más específica, el ácido nucleico codifica IL-1Ra-DHFR-IRES-Luc, en la que IRES es un sitio de entrada ribosomal interno y Luc es luciferasa. En otra realización específica, dicho ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que permite el control de la expresión de IL-1Ra o del polipéptido de fusión IL-1Ra-DHFR.

45 Se pueden administrar células adherentes derivadas del amnios, u otro tipo de células madre, modificadas por ingeniería genética usadas para el tratamiento de la AR, a un individuo con AR en cualquier combinación con dichas células madre que no se hayan modificado genéticamente.

### **5.2.5 Tratamiento de la esclerodermia**

50 En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene, o que está experimentando un síntoma de, o que está en riesgo de desarrollar esclerodermia, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios (es decir, un número de células) o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para producir una mejora detectable en uno o más síntomas de la esclerodermia, o suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la esclerodermia.

55 La esclerodermia es una enfermedad crónica que se caracteriza por depósitos excesivos de colágeno en la piel u otros órganos. La esclerodermia puede estar localizada o ser generalizada. La forma localizada de la enfermedad, aunque es incapacitante, no tiende a ser mortal. La forma generalizada de la enfermedad, que se manifiesta como la esclerodermia difusa o esclerosis sistémica, puede ser mortal como resultado de daño cardíaco, renal, pulmonar o intestinal. Los tres tipos de esclerodermia son esclerodermia difusa y esclerodermia limitada (síndrome de CREST), que son sistémicas, y esclerodermia morfea/lineal, que se limita a la piel. La esclerodermia difusa es la forma más grave, experimentando sus víctimas un inicio rápido, endurecimiento generalizado de la piel e importantes daños en

60

los órganos internos, en concreto, en los pulmones y en el tracto gastrointestinal.

La forma limitada de esclerodermia es mucho más suave, presenta un inicio y una progresión más lentos. El endurecimiento de la piel suele limitarse a las manos y a la cara, la afectación de los órganos internos es menos grave que en la forma difusa. Por lo general, el fenómeno de Raynaud puede preceder a la esclerodermia durante varios años. El fenómeno de Raynaud se debe a la vasoconstricción de las arterias pequeñas de las periferias expuestas - particularmente, de las manos y los pies - al frío, y se caracteriza clásicamente por un cambio de color trifásico - primero blanco, luego azul y, finalmente, rojo al volverse a calentar. La forma limitada se suele conocer como el síndrome de CREST, donde "CREST" es un acrónimo de las cinco características principales, calcinosis (depósitos de calcio en los tejidos blandos, por ejemplo, en la piel), síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia (esclerodermia de los dedos) y telangiectasias (arañas vasculares).

El desarrollo de la esclerodermia se ha correlacionado con la presencia de autoanticuerpos, particularmente anticuerpos anti-centrómero y anti-Scl70/anti-topoisomerasa. Hasta 90 % de los individuos afectados tiene un anticuerpo antinuclear detectable. El anticuerpo anti-centrómero es más común en la forma limitada (80-90 %) que en la forma sistémica (10 %), y el anticuerpo anti-Scl70 es más común en la forma difusa (30-40 %) y en pacientes afroamericanos.

Por lo tanto, en el método de tratamiento proporcionado en el presente documento, la administración de células adherentes derivadas del amnios inhibe el desarrollo de, reduce la gravedad de, o reduce la progresión de, uno o más síntomas de la esclerodermia. En una realización, la esclerodermia es la esclerodermia limitada. En otra realización, la esclerodermia es la esclerodermia difusa. En otra realización, la esclerodermia es morfea. En otra realización específica, el síntoma es uno o más de endurecimiento de la piel del rostro, endurecimiento de la piel de los dedos, síndrome de Reynaud, vasoconstricción inapropiada en una extremidad, calcinosis, telangiectasia o alteración de la motilidad esofágica. En otra realización específica, la administración de células adherentes derivadas del amnios reduce de forma detectable la cantidad o concentración en un mililitro de sangre del individuo de uno o más anticuerpos anti-nucleares, por ejemplo, un anticuerpo anti-centrómero o un anticuerpo anti-topoisomerasa.

En otra realización, el método de tratamiento proporcionado en el presente documento comprende la administración de un segundo agente terapéutico, en el que el segundo agente terapéutico es un fármaco antiinflamatorio, por ejemplo, un fármaco antiinflamatorio esteroideo o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), acetaminofeno, naproxeno, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, y similares. En una realización más específica en la que se administra un AINE, también se puede administrar un inhibidor de la bomba de protones (PPI), por ejemplo, omeprazol. En otra realización, el segundo agente terapéutico es un compuesto inmunosupresor tal como micofenolato mofetilo, ciclofosfamida o metotrexato. En otra realización, en la que el individuo afectado tiene ulceraciones digitales e hipertensión pulmonar, se puede administrar un vasodilatador tal como la prostaciclina (iloprost).

En otra realización, el segundo agente terapéutico es un segundo tipo de célula. En ciertas realizaciones, el segundo tipo de célula son células madre hematopoyéticas, por ejemplo, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>, por ejemplo, en una o más dosis de aproximadamente 10<sup>5</sup> células/kg a aproximadamente 10<sup>9</sup> células/kg. En otra realización específica, dicho segundo tipo de célula madre es una célula madre mesenquimal, por ejemplo, una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea. En otra realización específica, el segundo tipo de célula madre es una célula madre derivada de tejido adiposo. El segundo tipo de células madre, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre adiposas, o similares, se puede administrar con las células adherentes derivadas del amnios en cualquier proporción, por ejemplo, aproximadamente 100:1, 75:1, 50:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 1:75 o 1:100. Las células madre tales como las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea o las células madre derivadas de tejido adiposo, se pueden obtener en el mercado o de una fuente original, por ejemplo, médula ósea, aspirado de médula ósea, tejido adiposo, y similares.

Se puede administrar cualquier combinación de los agentes terapéuticos anteriores, adecuada para el tratamiento de la esclerodermia o un síntoma de la esclerodermia. Dichos agentes terapéuticos pueden administrarse en cualquier combinación con las células adherentes derivadas del amnios, al mismo tiempo o como un curso separado de tratamiento.

Las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento se pueden administrar al individuo que padece esclerodermia en forma de una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica adecuada para, por ejemplo, la inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

### 5.2.6 Tratamiento de la soriasis

En otra realización, en el presente documento se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene o está experimentando un síntoma de, o que está en riesgo de desarrollar, soriasis, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios (es decir, un número de células) o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para producir una mejora detectable en uno o más síntomas de la

soriasis, suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la soriasis o suficiente para reducir el progreso de la soriasis.

5 La soriasis es una enfermedad que afecta a la piel y a las articulaciones, que comúnmente causa parches escamosos rojos, denominados placas soriásicas, que aparecen en la piel. Los parches de soriasis son zonas de inflamación y producción excesiva de piel. La piel se acumula rápidamente en estas zonas y adopta una apariencia de color blanco plateado. Las placas se producen con frecuencia en la piel de los codos y las rodillas, pero pueden afectar a cualquier zona, incluyendo el cuero cabelludo y los genitales. Existe la hipótesis de que la soriasis está mediada por el sistema inmunitario.

10 Se han identificado varios tipos diferentes de soriasis. La soriasis en placas (soriasis vulgar), la forma más común de soriasis, normalmente aparece como zonas elevadas de piel inflamada cubiertas de piel escamosa blanca plateada, que se denominan placas. La soriasis flexural (soriasis inversa) aparece como parches inflamados uniformes de piel en los pliegues cutáneos, por ejemplo, alrededor de los genitales (entre el muslo y la ingle), las axilas, bajo un estómago con sobrepeso y debajo de los senos. La soriasis guttata se manifiesta como numerosas manchas pequeñas ovaladas (en forma de lágrima) que aparecen en grandes zonas del cuerpo, tales como el tronco, las extremidades y el cuero cabelludo. La soriasis guttata se asocia con la infección de garganta por estreptococos. La soriasis pustulosa aparece como protuberancias llenas de pus no infeccioso (pústulas). La soriasis pustulosa se puede localizar comúnmente en las manos y en los pies (pustulosis palmoplantar), o ser generalizada con parches extendidos que se producen aleatoriamente en cualquier parte del cuerpo. La soriasis ungueal produce una variedad de cambios en el aspecto de las uñas de las manos y de los pies, incluyendo la decoloración bajo la superficie de la uña, picaduras en las uñas, las líneas que atraviesan las uñas, engrosamiento de la piel de debajo de las uñas, y desprendimiento (onicólisis) y desmenuzamiento de la uña. La artritis soriásica consiste en la inflamación de las articulaciones y del tejido conjuntivo, por ejemplo, en las articulaciones de los dedos de las manos y de los pies, que puede dar lugar a una hinchazón en forma de salchicha de los dedos de las manos y de los pies, conocida como dactilitis. La artritis soriásica también puede afectar a las caderas, las rodillas y la columna vertebral (espondilitis). La soriasis eritrodérmica se manifiesta como la inflamación y la exfoliación generalizadas de la piel sobre la mayor parte de la superficie del cuerpo. Puede ir acompañada de picazón, hinchazón y dolor graves. A menudo se produce como consecuencia del agravamiento de la soriasis de placas inestables, sobre todo tras la retirada brusca del tratamiento sistémico. Esta forma de soriasis puede ser mortal, pues la inflamación y la exfoliación extremas afectan a la capacidad del organismo para regular la temperatura y para que la piel pueda realizar las funciones de barrera.

30 En una realización, por lo tanto, la invención proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene soriasis, donde la soriasis es uno de los tipos de soriasis enumerados anteriormente, que comprende administrar al individuo una dosis terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios, en el que dicha dosis eficaz es una cantidad de células adherentes derivadas del amnios (es decir, un número de células) suficiente, por ejemplo, para producir una mejora detectable en, reducir la gravedad de o reducir la progresión de uno o más de los síntomas de la soriasis anteriormente mencionados.

La gravedad de la soriasis se puede evaluar, por ejemplo, con el índice de gravedad de las zonas con soriasis (PASI). El PASI combina la evaluación de la gravedad de las lesiones y la zona afectada en una sola puntuación en el intervalo de 0 (sin enfermedad) a 72 (enfermedad máxima).

40 Para calcular el PASI, el cuerpo se divide en cuatro secciones: piernas, cuerpo (superficie del tronco (estómago, pecho, espalda, etc.); brazos y cabeza. Cada una de estas zonas se puntúa por sí misma, y luego se combinan las cuatro puntuaciones en el PASI final. Para cada sección, se estima el porcentaje de superficie de piel afectada con soriasis y, después, se transforma en un grado de 0 a 6, de la siguiente manera:

Porcentaje de superficie afectada	Grado
0	0
< 10	1
10-29 %	2
30-49	3
50-69	4
70-89	5
90-100	6

45 La gravedad se estima mediante cuatro parámetros diferentes, graduados de 0 a 4: prurito, eritema (enrojecimiento), descamación y engrosamiento. Después, se calcula la suma de los cuatro parámetros de gravedad para cada sección de la piel, se multiplica por la puntuación de superficie para esa zona y se multiplica por el peso de la respectiva sección (0,1 para la cabeza, 0,2 para los brazos, 0,3 para el cuerpo y 0,4 para las piernas). Ejemplo:  $(I_{\text{cuerpo}} + E_{\text{cuerpo}} + S_{\text{cuerpo}} + T_{\text{cuerpo}}) \times A_{\text{cuerpo}} \times 0,3 = \text{Total}_{\text{cuerpo}}$ . Finalmente, se calcula el PASI total como una suma de los PASI de las cuatro secciones de piel.

50 El grado de gravedad también se puede evaluar fotografiando al individuo afectado de soriasis, y calculando, por ordenador, el porcentaje de superficie del cuerpo que está cubierta por las lesiones soriásicas.

Por lo tanto, en realizaciones específicas del método de tratamiento proporcionado en el presente documento, la soriasis es soriasis en placas (soriasis vulgar), soriasis flexural (soriasis inversa), soriasis guttata, soriasis pustulosa, soriasis ungueal, artritis soriásica o soriasis eritodérmica. En una realización específica del método, la cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios es una cantidad suficiente para producir una mejora en, un retraso en el inicio de o una reducción de la progresión de uno o más síntomas de la soriasis, donde dichos uno o más síntomas son descamación de la piel, enrojecimiento de la piel, engrosamiento de la piel, formación de placas, decoloración bajo la placa de las uñas, picaduras de las uñas, líneas que atraviesan las uñas, engrosamiento de la piel debajo de las uñas, onicólisis, desarrollo de pústulas, inflamación de las articulaciones o del tejido conjuntivo, inflamación de la piel o exfoliación de la piel. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios es una cantidad suficiente para producir una reducción de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más puntos en el índice de gravedad de las zonas con soriasis.

En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios se administra en combinación con un segundo tratamiento. El segundo tratamiento puede ser tópico, por ejemplo, cremas o pomadas que comprenden uno o más de un corticosteroide (por ejemplo, desoximetasina), un análogo de la vitamina D<sub>3</sub> (por ejemplo, calcipotriol), antralina, aceite de argán, un retinoide o alquitrán de hulla. En otra realización específica, el segundo tratamiento comprende una o más exposiciones, por ejemplo, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 minutos, a la luz ultravioleta, por ejemplo, UVB de una longitud de onda entre aproximadamente 280 nm y aproximadamente 315 nm, particularmente de aproximadamente 311 nm a aproximadamente 312 nm. En otra realización específica, el segundo tratamiento comprende la administración tópica de psoraleno en combinación con la exposición a la luz UVA. En otra realización específica, el segundo tratamiento comprende una o más administraciones sistémicas de uno o más de, por ejemplo, metotrexato, ciclosporina, un retinoide, tioguanina, hidroxiurea, sulfasalazina, micofenolato mofetilo, azatioprina, tacrolimus oral y/o un éster de ácido fumárico.

### 5.2.7 Tratamiento del lupus eritematoso

En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene o que está experimentando un síntoma de, o que está en riesgo de desarrollar, lupus eritematoso (LE), que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para producir una mejora detectable en uno o más síntomas del LE, suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas del LE, o suficiente para reducir el progreso del LE.

Los síntomas del LE son numerosos y la enfermedad puede progresar de forma diferente en diferentes individuos. Los síntomas pueden incluir manifestaciones dermatológicas (por ejemplo, eritema malar (también denominado erupción de mariposa), lupus discoide (parches escamosos rojos, gruesos, en la piel), alopecia, úlceras bucales, nasales y vaginales, y/o lesiones en la piel); manifestaciones musculoesqueléticas (por ejemplo, dolor articular); manifestaciones hematológicas (por ejemplo, anemia y deficiencia de hierro, recuentos de plaquetas y de glóbulos blancos inferiores a los normales, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (un trastorno trombótico en el que hay autoanticuerpos contra los fosfolípidos presentes en el suero del paciente) y/o presencia de anticuerpos anti-cardiolipina en la sangre); manifestaciones cardíacas (por ejemplo, pericarditis, miocarditis y/o endocarditis); manifestaciones pulmonares (por ejemplo, inflamación pulmonar y/o pleural, pleuritis, derrame pleural, neumonitis lúpica, enfermedad pulmonar intersticial difusa crónica, hipertensión pulmonar, embolia pulmonar y/o hemorragia pulmonar); manifestaciones hepáticas (por ejemplo, hepatitis autoinmune; ictericia; presencia de anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos del músculo liso (SMA), anticuerpo microsomal hepático/renal (LKM-1) y/o anticuerpo anti-mitocondrial (AMA) en el torrente sanguíneo); manifestaciones renales (por ejemplo, hematuria o proteinuria indoloras, nefritis lúpica, insuficiencia renal y/o desarrollo de glomerulonefritis membranosa con anomalías de "asa de alambre"); manifestaciones neurológicas (por ejemplo, convulsiones, sicosis, alteraciones en el líquido cefalorraquídeo); anomalías en los linfocitos T (por ejemplo, deficiencia en la CD45 fosfatasa y/o aumento de la expresión del ligando CD40); y/o manifestaciones inespecíficas (por ejemplo, gastroenteritis lúpica, pancreatitis lúpica, cistitis lúpica, enfermedad inmunitaria del oído interno, disfunción parasimpática, vasculitis retinal, vasculitis sistémica, aumento de la expresión de Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ , niveles de calcio crecientes y sostenidos en los linfocitos T, aumento de inositol trifosfato en la sangre, reducción de la fosforilación de la proteína quinasa C, reducción de la señalización de la quinasa Ras-MAP y/o deficiencia de la actividad de la proteína quinasa A I.

Por lo tanto, en una realización específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios es una cantidad eficaz para producir una mejora detectable en uno o más síntomas del LE, suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas del LE o suficiente para reducir el empeoramiento de uno o más síntomas del LE, en la que dicho uno o más síntomas comprenden una o más manifestaciones dermatológicas, hematológicas, musculoesqueléticas, neurológicas, renales, hepáticas o de los linfocitos T del LE. En otra realización específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para producir una mejora detectable en uno o más síntomas del LE, suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas del LE o suficiente



para reducir el empeoramiento de uno o más síntomas del LE, en la que dichos uno o más síntomas comprenden eritema malar, erupción de mariposa, lupus discoide, alopecia, úlceras bucales, nasales y vaginales, lesiones en la piel, dolor articular, anemia y deficiencia de hierro, recuentos de plaquetas y de glóbulos blancos inferiores a los normales, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, presencia de anticuerpos anti-cardiolipina en la sangre, pericarditis, miocarditis, endocarditis, inflamación pulmonar y/o pleural, pleuritis, derrame pleural, neumonitis lúpica, enfermedad pulmonar intersticial difusa crónica, hipertensión pulmonar, embolia pulmonar, hemorragia pulmonar, hepatitis autoinmune; ictericia; presencia de anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos del músculo liso (SMA), anticuerpo microsomal hepático/renal (LKM-1) y/o anticuerpo anti-mitocondrial (AMA) en el torrente sanguíneo, hematuria o proteinuria indoloras, nefritis lúpica, insuficiencia renal y/o desarrollo de glomerulonefritis membranosa con anomalías de "asa de alambre"); manifestaciones neurológicas (por ejemplo, convulsiones, sicosis, alteraciones en el líquido cefalorraquídeo); anomalías en los linfocitos T (por ejemplo, deficiencia en la CD45 fosfatasa y/o aumento de la expresión del ligando CD40); y/o manifestaciones inespecíficas (por ejemplo, gastroenteritis lúpica, pancreatitis lúpica, cistitis lúpica, enfermedad inmunitaria del oído interno, disfunción parasimpática, vasculitis retinal, vasculitis sistémica, aumento de la expresión de Fc $\epsilon$ R1y, niveles de calcio crecientes y sostenidos en los linfocitos T, aumento de inositol trifosfato en la sangre, reducción de la fosforilación de la proteína quinasa C, reducción de la señalización de la quinasa Ras-MAP y/o deficiencia de la actividad de la proteína quinasa A I.

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden administrar al individuo que padece esclerodermia en forma de una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica adecuada para, por ejemplo, la inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

#### 20 **5.2.8 Tratamiento de la micosis fungoide**

En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene o que está experimentando un síntoma de, o que está en riesgo de desarrollar, micosis fungoide, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios (es decir, un número de células) o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para producir una mejora detectable en uno o más síntomas de la micosis fungoide, suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la micosis fungoide, o suficiente para reducir el progreso de la micosis fungoide.

La micosis fungoide es el más común de los linfomas cutáneos de linfocitos T, un grupo de cánceres raros que crecen en la piel. El síndrome de Sezary, una forma más rara en la que los linfocitos T afectan a la sangre periférica, así como a la piel, se produce en aproximadamente 5 % de todos los casos de micosis fungoide. La micosis fungoide, en general, progresa en etapas definidas por los síntomas de la piel: (1) fase de parche, en la que la piel tiene parches rojos planos o, en personas de piel oscura, parches muy claros o muy oscuros, que pican mucho y que pueden estar elevados y duros (placas); (2) fase de tumores cutáneos, en la que aparecen protuberancias de color rojo-violeta (nódulos), que pueden tener forma de bóveda (como un champiñón) o estar ulceradas; (3) fase de enrojecimiento de la piel (eritrodermia), en la que la piel del individuo desarrolla grandes zonas rojas que pican mucho y son escamosas, y en la que la piel de las palmas de las manos y de las plantas de los pies pueden engrosarse y agrietarse; y (4) fase de los ganglios linfáticos, en la que la micosis fungoide empieza a desplazarse a otras partes del cuerpo por los ganglios linfáticos, que se inflaman, y suele ser canceroso, pudiéndose diseminar al hígado, a los pulmones o a la médula ósea.

Así pues, en una realización específica, la cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios es una cantidad eficaz para producir una mejora detectable en uno o más síntomas de la micosis fungoide, suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la micosis fungoide, o suficiente para reducir el empeoramiento de uno o más síntomas de la micosis fungoide, en la que dichos uno o más síntomas comprenden una o más manifestaciones dermatológicas, hematológicas, musculoesqueléticas, neurológicas, renales, hepáticas o de linfocitos T de la micosis fungoide. En otra realización específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para producir una mejora detectable en uno o más síntomas de la micosis fungoide, suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la micosis fungoide, o suficiente para reducir el empeoramiento de uno o más síntomas de micosis fungoide, en la que dichos uno o más síntomas comprenden parches claros u oscuros de la piel que pican, placas cutáneas, desarrollo de los tumores de la piel, protuberancias en la piel, desarrollo de zonas de la piel que son de color rojo, escamosas y que pican, engrosamiento de la piel de las palmas de las manos o de las plantas de los pies, agrietamiento de la piel de las palmas de las manos o de las plantas de los pies, o inflamación de los ganglios linfáticos.

En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de las células adherentes derivadas del amnios o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios se administra en combinación con un segundo tratamiento o segundo agente terapéutico. En realizaciones más específicas, el segundo tratamiento o agente terapéutico es uno o más de la exposición de una zona afectada de dicho individuo a la luz solar o a la luz ultravioleta, esteroides tópicos, radioterapia superficial local, radiación total de haz de electrones en la piel, aplicación de miel orgánica (Manuka) en la piel afectada por la eritrodermia, o terapias biológicas. En una realización más específica, dichas terapias biológicas comprenden la administración al individuo de uno o más de un interferón, un retinoide, un rexinoide, vorinostat (por ejemplo, ZOLINZA®).

**5.2.9 Tratamiento de la diabetes**

En otra realización, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene o que está experimentando un síntoma de, o que está en riesgo de desarrollar, la diabetes, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios (es decir, un número de células) o de medio de cultivo acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para producir una mejora detectable en uno o más síntomas de la diabetes, suficiente para reducir de forma detectable la aparición de uno o más síntomas de la diabetes, o suficiente para reducir el progreso de la diabetes. En una realización específica, la diabetes es diabetes mellitus de tipo 1, también conocida como diabetes de tipo 1, diabetes de tipo I, DT1 o diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM).

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden administrar una o más veces durante el curso de la enfermedad. Preferentemente, las células madre se administran a los 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, o 1 semana, del primer diagnóstico. En una realización, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de las células adherentes derivadas del amnios es una cantidad suficiente para revertir, reducir la gravedad de o mejorar de otra manera un síntoma de la diabetes mellitus de tipo 1, incluyendo niveles de glucemia anormalmente elevados, falta de resistencia a la insulina determinada mediante un ensayo de tolerancia a glucosa, fatiga o pérdida de la conciencia.

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden administrar en combinación con un segundo tratamiento, por ejemplo, trasplante de tejido pancreático y/o células de los islotes; tratamiento con células madre autólogas o alogénicas, o similares.

**5.2.10 Tratamiento de otras enfermedades o trastornos relacionados con el sistema inmunitario**

En el presente documento, también se proporcionan métodos de tratamiento de otras enfermedades o afecciones relacionadas con el sistema inmunitario usando AMDAC. En otras realizaciones, por ejemplo, en el presente documento, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o un trastorno, en el que la enfermedad o el trastorno está causado por, o está asociado con, una respuesta inmunitaria inapropiada o no deseable, por ejemplo, una enfermedad, un trastorno o una afección que se pueda tratar de forma beneficiosa mediante inmunosupresión, que comprende administrar al individuo las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento. En diversas realizaciones específicas, dicha enfermedad relacionada con el sistema inmunitario es una o más de la enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, síndrome antifosfolípido (primario o secundario), asma, gastritis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad del oído interno autoinmune, enfermedad linfoproliferativa autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, enfermedad de Balo, enfermedad de Behcet, penfigoide ampoloso, cardiomiopatía, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, penfigoide cicatricial (por ejemplo, penfigoide de las mucosas), enfermedad por crioaglutininas, enfermedad de Degos, dermatitis hepatoformis, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto (enfermedad de Hashimoto, tiroiditis autoinmune), fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía de IgA, artritis juvenil, liquen plano, enfermedad de Menière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, morfea, miastenia gravis, narcolepsia, neuromiotonía, trastornos neuropsiquiátricos autoinmunes pediátricos (PANDA), pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, polimialgia reumática, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Raynaud (fenómeno de Raynaud), síndrome de Reiter, policondritis recurrente, fiebre reumática, síndrome de Sjogren, síndrome del individuo rígido (síndrome de Moersch-Woltmann), arteritis de Takayasu, arteritis temporal (arteritis de células gigantes), uveítis, vasculitis (por ejemplo, vasculitis no asociada con el lupus eritematoso), vitíligo y/o granulomatosis de Wegener.

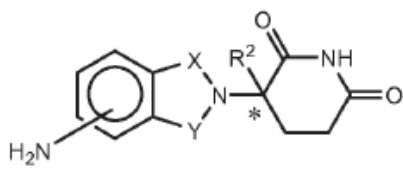
En otras diversas realizaciones específicas, dicha enfermedad inmunitaria es una o más de miositis inflamatoria, dermatomiositis, dermatomiositis (juvenil), miositis juvenil, miositis por cuerpos de inclusión y/o polimiositis (por ejemplo, con dermatomiositis).

**5.2.11 Segundas composiciones terapéuticas y segundos tratamientos**

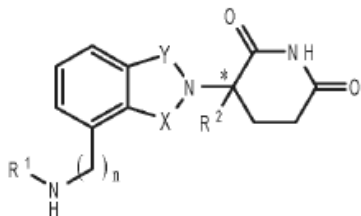
En cualquiera de los métodos de tratamiento anteriores, el método puede comprender la administración de una segunda composición terapéutica o un segundo tratamiento. La enumeración de los segundos compuestos terapéuticos específicos o segundos tratamientos de los métodos de tratamiento de enfermedades específicas anteriores no pretende ser excluyente. Por ejemplo, cualquiera de las enfermedades, trastornos o afecciones que se describen en el presente documento se puede tratar con cualquiera de los compuestos antiinflamatorios o compuestos inmunosupresores que se describen en el presente documento. En realizaciones en las que las células adherentes derivadas del amnios se administran con un segundo agente terapéutico o con un segundo tipo de célula madre, las células adherentes derivadas del amnios y el segundo agente terapéutico y/o segundo tipo de células madre se pueden administrar al mismo tiempo o en diferentes momentos, por ejemplo, las administraciones pueden tener lugar con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 minutos de separación, o con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22 horas de separación, o con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más días de separación.

En una realización específica, el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una afección relacionado o causado por una respuesta inmunitaria inapropiada, perjudicial o dañina comprende la administración de un segundo tipo de célula madre, o de una población de un segundo tipo de célula madre, además de las células adherentes derivadas del amnios. En una realización específica, dicho segundo tipo de célula madre es una célula madre mesenquimal, por ejemplo, una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea. En otra realización, el segundo tipo de célula madre es una célula madre derivada de tejido adiposo. En otras realizaciones, el segundo tipo de célula madre es una célula madre multipotente, una célula madre pluripotente, una célula progenitora, una célula madre hematopoyética, por ejemplo, célula madre hematopoyética CD34<sup>+</sup>, una célula madre adulta, una célula madre embrionaria o una célula germinal embrionaria. El segundo tipo de célula madre, por ejemplo, célula madre mesenquimal o célula madre derivada de tejido adiposo, se puede administrar con las células adherentes derivadas del amnios en cualquier proporción, por ejemplo, una proporción de aproximadamente 100:1, 75:1, 50:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 1:75 o 1:100. Las células madre mesenquimales se pueden obtener en el mercado o de una fuente original, por ejemplo, médula ósea, aspirado de médula ósea, tejido adiposo, y similares.

En otra realización específica, dicho segundo tratamiento comprende un compuesto inmunomodulador, en la que el compuesto inmunomodulador es 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona; 3-(4'-aminoisolidolin-1'-ona)-1-piperidin-2,6-diona; 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona; o  $\alpha$ -(3-aminofalimidoglutarimida. En una realización más específica, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



en la que uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es C=O o CH<sub>2</sub>, y R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo inferior, o una sal, un hidrato, un solvato, un clatrato, un enantiómero, un diastereómero, un racemato o una mezcla de estereoisómeros del mismo farmacéuticamente aceptable. En otra realización más específica, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



en la que

uno de X e Y es C=O, el otro de es CH<sub>2</sub> o C=O,

R<sup>1</sup> es H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo, alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarilo (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), C(O)R<sup>3</sup>, C(S)R<sup>3</sup>, C(O)OR<sup>4</sup>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-OR<sup>5</sup>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-C(O)OR<sup>5</sup>, C(O)NHR<sup>3</sup>, C(S)NHR<sup>3</sup>, C(O)NR<sup>3</sup>R<sup>3'</sup>, C(S)NR<sup>3</sup>R<sup>3'</sup> o alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-O(CO)R<sup>5</sup>;

R<sup>2</sup> es H, F, bencilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) o alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>3</sup> y R<sup>3'</sup> son independientemente alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo, alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarilo (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>)-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-OR<sup>5</sup>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-C(O)OR<sup>5</sup>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-C(CO)R<sup>5</sup> o C(O)OR<sup>5</sup>.

R<sup>4</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-OR<sup>5</sup>, bencilo, arilo, alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarilo (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>);

R<sup>5</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo o heteroarilo (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>);

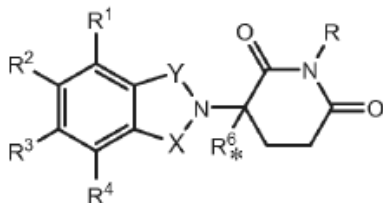
cada aparición de R<sup>6</sup> es independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo, heteroarilo (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) o alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>)-C(O)O-R<sup>5</sup> o los grupos R<sup>6</sup> se pueden unir para formar un grupo heterocicloalquilo;

n es 0 o 1; y

\* representa un centro quiral en carbono;

o una sal, un hidrato, un solvato, un clatrato, un enantiómero, un diastereómero, un racemato o una mezcla de estereoisómeros del mismo farmacéuticamente aceptable. En otra realización más específica, dicho compuesto

inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura:



en la que:

- 5 uno de X e Y es C=O y el otro es CH<sub>2</sub> o C=O;  
 R es H o CH<sub>2</sub>OCOR';  
 (i) cada uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup>, independientemente entre sí, es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> es nitro o -NHR<sup>5</sup>, y los restantes R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> son hidrógeno;  
 R<sup>5</sup> es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono;  
 10 R<sup>6</sup> hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro o fluoro;  
 R' es R<sup>7</sup>-CHR<sup>10</sup>-N(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>);  
 R<sup>7</sup> es *m*-fenileno o *p*-fenileno o -(C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)- en el que n tiene un valor de 0 a 4;  
 cada R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> tomado independientemente entre sí es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> tomados conjuntamente son tetrametileno, pentametileno, hexametileno o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, en el que X<sub>1</sub> es  
 15 -O-, -S- o -NH-;  
 R<sup>10</sup> es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono o fenilo; y  
 \*representa un centro quiral en carbono;

o una sal, un hidrato, un solvato, un clatrato, un enantiómero, un diastereómero, un racemato o una mezcla de estereoisómeros del mismo farmacéuticamente aceptable.

- 20 Se puede administrar cualquier combinación de los agentes terapéuticos anteriores. Dichos agentes terapéuticos pueden administrarse en cualquier combinación con las células adherentes derivadas del amnios, al mismo tiempo o como un curso separado de tratamiento.

- 25 Las células adherentes derivadas del amnios se pueden administrar, al individuo que padece una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario, en forma de una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica adecuada para la inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal. Las células adherentes derivadas del amnios se pueden administrar en una sola dosis o en múltiples dosis. Cuando las células adherentes derivadas del amnios se administran en múltiples dosis, las dosis pueden formar parte de un régimen terapéutico diseñado para aliviar uno o más síntomas agudos de una enfermedad o de un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, por ejemplo, EII, por ejemplo, enfermedad de Crohn, de puede formar parte de un régimen terapéutico a  
 30 largo plazo diseñado para evitar, o reducir la gravedad, de, por ejemplo, un curso crónico de la enfermedad. En realizaciones en las que las células adherentes derivadas del amnios se administran con un segundo agente terapéutico, o con un segundo tipo de célula madre, las células adherentes derivadas del amnios y el segundo agente terapéutico y/o segundo tipo de células madre se pueden administrar al mismo tiempo o en diferentes momentos, por ejemplo, las administraciones pueden tener lugar con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 20, 30, 40 o 50  
 35 minutos de separación, o con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22 horas de separación, o con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8, 9 o 10 o más días de separación.

### 5.3 CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

- 40 Los métodos proporcionados en el presente documento usan células derivadas del amnios, adherentes al plástico de cultivo tisular, y poblaciones de dichas células, denominadas en el presente documento "células adherentes derivadas del amnios" o AMDAC. En general, las células adherentes derivadas del amnios tienen un aspecto semejante superficialmente a los fibroblastos o a las células mesenquimales, con una forma generalmente fibroblastoide. Dichas células se adhieren a una superficie de cultivo de células, por ejemplo, al plástico de cultivo tisular. En ciertas realizaciones de cualquiera de las AMDAC desveladas en el presente documento, las células son células humanas.

- 45 Las AMDAC proporcionadas en el presente documento muestran marcadores celulares que las distinguen de otras células derivadas del amnios o derivadas de la placenta. En ciertas realizaciones de cada una de las realizaciones de AMDAC descritas en el presente documento, las AMDAC están aisladas.

- 50 En una realización, las células adherentes derivadas del amnios son OCT-4<sup>-</sup> (proteína 4 de unión al octámero) según lo determinado mediante RT-PCR. En otra realización específica, las células adherentes derivadas del amnios OCT-4<sup>-</sup> son CD49f<sup>+</sup>, determinadas, por ejemplo, por inmunolocalización, por ejemplo, por citometría de flujo. En otra realización específica, dichas células OCT-4<sup>-</sup> son HLA-G<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR. En otra

realización específica, las células OCT-4<sup>-</sup> son VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> (receptor 1 del factor de crecimiento vascular endotelial) y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup> (receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial), según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización específica, las células adherentes derivadas del amnios OCT-4<sup>-</sup> expresan al menos 2 registros menos de ARNm amplificado por PCR para OCT-4<sup>-</sup> en, por ejemplo, 20 ciclos, de un número equivalente de células NTERA-2 y ciclos de amplificación de ARN. En otra realización específica, dichas células OCT-4<sup>-</sup> son CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> o CD117<sup>-</sup> según lo determinado, por ejemplo, por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización más específica, dichas células son OCT-4<sup>-</sup> o HLA-G<sup>-</sup> y, además, CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, y CD117<sup>-</sup> según lo determinado, por ejemplo, por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización más específica, las células son OCT-4<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>, según lo determinado, por ejemplo, por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, las células OCT-4<sup>-</sup> no expresan SOX2, por ejemplo, según lo determinado mediante RT-PCR durante 30 ciclos. En una realización específica, por lo tanto, las células adherentes derivadas del amnios son OCT-4<sup>-</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, y CD117<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y SOX2<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos.

En una realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son GFAP<sup>+</sup>, por ejemplo, según lo determinado mediante un ensayo de diferenciación neuronal a corto plazo (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.3, más adelante). En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son beta-tubulina III (Tuj1)<sup>+</sup>, por ejemplo, según lo determinado mediante un ensayo de diferenciación neuronal a corto plazo. En otra realización específica, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, GFAP<sup>+</sup> y beta-tubulina III (Tuj1)<sup>+</sup>. En otra realización específica, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD49f<sup>+</sup>. En otra realización específica, las AMDAC son CD200<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> y CD73<sup>+</sup>. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son CD117<sup>-</sup> y no se seleccionan usando un anticuerpo contra CD117. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son CD146<sup>-</sup> y no se seleccionan usando un anticuerpo contra CD146. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado por RT-PCR y/o inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y no expresan CD34 tras la inducción con VEGF según lo determinado mediante RT-PCR y/o inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, las AMDAC usadas en los métodos descritos en el presente documento son neurogénicas, según lo determinado mediante un ensayo de diferenciación neuronal a corto plazo (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.3, más adelante). En otra realización específica, las AMDAC usadas en los métodos descritos en el presente documento son no condrogénicas, según lo determinado mediante un ensayo *in vitro* del potencial condrogénico (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.2, más adelante). En otra realización específica, las AMDAC usadas en los métodos descritos en el presente documento son no osteogénicas, según lo determinado mediante un ensayo de fenotipo osteogénico (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.1, más adelante). En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son no osteogénicas tras haber sido cultivadas durante un máximo de 6 semanas (por ejemplo, durante 2 semanas, durante 4 semanas o durante 6 semanas) en DMEM a pH 7,4 (niveles altos de glucosa) complementado con dexametasona 100 nM, fosfato de β-glicerol 10 mM, L-ácido ascórbico-2-fosfato 50 μM, en el que la osteogénesis se evalúa mediante tinción de von Kossa; tinción con rojo alizarina; o mediante la detección de la presencia de la osteopontina, osteocalcina, osteonectina y/o sialoproteína ósea por, por ejemplo, RT-PCR.

En otra realización, dichas células OCT-4<sup>-</sup> son una o más de CD29<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, ABC-p<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo.

En otra realización específica, por ejemplo, dichas AMDAC OCT-4<sup>-</sup> pueden ser, además, una o más de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup> (marcador endotelial tumoral 7), CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup> (enzima convertidora de la angiotensina I, ACE), CD146<sup>-</sup> (molécula de adhesión a células de melanoma) o CXCR4<sup>-</sup> (receptor 4 de quimiocina (motivo C-X-C)) según lo determinado, por ejemplo, mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, o HLA-G<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR. En una realización más específica, dichas células son CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup> y CXCR4<sup>-</sup>, según lo determinado, por ejemplo, mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y HLA-G<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR. En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios son una o más de CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y/o CD133<sup>-</sup>, según lo determinado, por ejemplo, mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización específica, las células adherentes derivadas del amnios OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado por RT-PCR; VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; y una o más, o todos, de CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y/o CD133<sup>-</sup>, según lo determinado, por ejemplo, mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo.

En otra realización específica, dichas AMDAC son, además, VE-cadherina<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas células OCT-4<sup>-</sup> son, bien solas o en combinación con otros marcadores, además, positivas para CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas células no expresan CD34, detectado por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo tras la exposición a 1 a 100 ng/ml de VEGF durante de 4 a 21 días. En realizaciones más específicas, dichas células no expresan CD34 según lo detectado por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, tras la exposición a 25 a 75 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días, o a 50 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En realizaciones incluso más específicas, dichas

células no expresan CD34 según lo detectado por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, tras la exposición a 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75 o 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En realizaciones aún más específicas, dichas células no expresan CD34 según lo detectado por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, tras la exposición a 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 7 a 14, por ejemplo, 7 días.

5 En realizaciones específicas, las células adherentes derivadas del amnios son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y una o más de VE-cadherina<sup>-</sup>, VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y/o CD200<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización específica, las células adherentes derivadas del amnios son OCT-4<sup>-</sup> según lo determinado mediante RT-PCR, y la VE-cadherina<sup>-</sup>, VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas células no expresan CD34, según lo detectado por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, por ejemplo, tras la exposición a 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días.

10 En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios son OCT-4<sup>-</sup>, CD49f<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>. En una realización más específica, dichas células son una o más de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup> o CXCR4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización más específica, dichas células CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup> y CXCR4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, la citometría de flujo. En otra realización específica, dichas células son además VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; y una o más de CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y/o Tie-2<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas células son además VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup>, VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y Tie-2<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo.

15 En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios OCT-4<sup>-</sup> son además, una o varias, o todas, de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup> (CD309<sup>+</sup>), según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; o además una o más, o todas, de CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD144<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup>, CD271<sup>-</sup>, CXCR4<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup> y/o VE-cadherina<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, o SOX2<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR.

20 En ciertas realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios que se adhieren al plástico de cultivo tisular aisladas son CD49f<sup>+</sup>. En una realización específica, dichas células CD49f<sup>+</sup> son, además, una o varias, o todas, de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup> (CD309<sup>+</sup>), según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; o además una o más, o todas, de CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD144<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup>, CD271<sup>-</sup>, CXCR4<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, OCT-4<sup>-</sup> y/o VE-cadherina<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, o SOX2<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR.

25 En otras ciertas realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios que se adhieren al plástico de cultivo tisular aisladas son HLA-G<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>. En una realización específica, dichas células HLA-G<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup> son, además, una o varias, o todas, de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup> (CD309<sup>+</sup>), según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; o además una o más, o todas, de CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD144<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup>, CD271<sup>-</sup>, CXCR4<sup>-</sup>, OCT-4<sup>-</sup> y/o VE-cadherina<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, o SOX2<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR.

30 En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios aisladas no expresan constitutivamente ARNm para la angiopoyetina 4 (ANGPT4), angiopoyetina 3 (ANGPTL3), cadherina 5, tipo 2 (CDH5), proteína gamma-carboxiglutamato (gla) ósea (BGLAP), CD31, CD34, ligando 10 de quimiocinas (motivo C-X-C) (CXCL10), *distal-less homeobox 5* (DLX5), cadena  $\alpha$  de fibrinógeno (FGA), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), tirosina quinasa 3 de tipo FMS (FLT3), HLA-G, interferón  $\gamma$  (IFNG), quimiotaxina 1 derivada de leucocitos (LECT1), leptina (LEP), metaloproteasa matricial 13 (MMP-13), NANOG, nestina, plasminógeno (PLG), POU5F1 (OCT-4), prolactina (PRL), Prokineticina 1 (PROK1), (región determinante del sexo Y)-box 2 (SOX2), telomerasa transcriptasa inversa (TERT), tenomodulina (TNMD) y/o dominio de enlace extracelular que contiene 1 (XLKD1), según lo determinado mediante RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos en condiciones de cultivo convencionales.

35 En otras realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios aisladas, o la población de células adherentes derivadas del amnios, expresan ARNm para (ARNT2), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), neurotrofina 3 (NT-3), NT-5, Factor 1 $\alpha$  inducible por hipoxia (HIF1A), proteína inducible por hipoxia 2 (HIG2), hemoxigenasa (descicladora) 1 (HMOX1), superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn] (SOD3), catalasa (CAT), factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGFB1), receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGFB1R) y receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGFR/c-met).

En otro aspecto, en el presente documento, se proporcionan poblaciones aisladas de células, por ejemplo, poblaciones aisladas de células del amnios o células de la placenta, o poblaciones esencialmente aisladas de AMDAC, que comprenden las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento. Las poblaciones de células pueden ser poblaciones homogéneas, por ejemplo, una población de células, cuyo al menos aproximadamente 90 %, 95 %, 98 % o 99 % es células adherentes derivadas del amnios. Las poblaciones de células pueden ser heterogéneas, por ejemplo, una población de células en la que, como máximo, aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o 80 % de las células de la población son células adherentes derivadas del amnios. Las poblaciones aisladas de células no son, sin embargo, tejido, es decir, membrana amniótica.

En una realización, en el presente documento, se proporciona una población aislada de células que comprende AMDAC, por ejemplo, una población de células esencialmente homogéneas para AMDAC, o una población de células heterogéneas con respecto a las AMDAC, en la que dichas AMDAC se adhieren al plástico de cultivo tisular, y en la que dichas AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR. En una realización específica, las AMDAC son CD49f<sup>+</sup> o HLA-G<sup>+</sup>, por ejemplo, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, o RT-PCR. En otra realización específica, dichas AMDAC de dicha población de células son VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, en la que dicha población aislada de células no es un amnios ni una membrana amniótica u otro tejido. En una realización más específica, las AMDAC de dicha población de células son OCT-4<sup>-</sup> y/o HLA-G<sup>-</sup> según lo determinado mediante RT-PCR, y VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas AMDAC son CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> o CD117<sup>-</sup>. En una realización más específica, dichas AMDAC son CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>. En una realización más específica, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>. En otra realización específica, las AMDAC no expresan SOX2, por ejemplo, según lo determinado mediante RT-PCR durante 30 ciclos. En una realización aún más específica, la población comprende AMDAC, en la que dichas AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y SOX2<sup>-</sup>, por ejemplo, según lo determinado mediante RT-PCR durante 30 ciclos.

En otra realización específica, dichas AMDAC de dicha población de células son CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> o CD117<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización más específica, las AMDAC son CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización más específica, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup> o HLA-G<sup>-</sup>, por ejemplo, según lo determinado mediante RT-PCR, y son, además, CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En una realización más específica, las AMDAC de la población de células son OCT-4<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>. En otra realización específica, las AMDAC no expresan SOX2, por ejemplo, según lo determinado mediante RT-PCR durante 30 ciclos. En una realización más específica, por lo tanto, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y SOX2<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos. En una realización aún más específica, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup> o HLA-G<sup>-</sup>, y son, además, CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>. En una realización más específica, las AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD49f<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>.

En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios de dicha población de células se adhieren al plástico de cultivo tisular, OCT-4<sup>-</sup> según lo determinado mediante RT-PCR, y VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y son, además, una o más de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup> o CXCR4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, o HLA-G<sup>-</sup> según lo determinado mediante RT-PCR, y en la que dicha población aislada de células no es un amnios. En otra realización, en el presente documento, se proporciona una población aislada de células que comprende células adherentes derivadas del amnios, en la que dichas células se adhieren al plástico de cultivo tisular, en la que dichas células son OCT-4<sup>-</sup> según lo determinado mediante RT-PCR, y VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y/o VEGFR2/KDR<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, en la que dichas células no expresan CD34 como se detecta por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, tras la exposición a 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días, y en la que dicha población aislada de células no es un amnios.

En una realización específica de cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células de dicha población es de dichas células adherentes derivadas del amnios, según lo descrito o caracterizable mediante cualquiera de las combinaciones de marcadores celulares descritos anteriormente.

En otra realización, ninguna de las poblaciones anteriores de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios forma brotes o estructuras de tipo tubular cuando se cultivan en presencia de una proteína de la matriz extracelular, por ejemplo, como el colágeno de tipo I y IV, o un factor angiogénico, por ejemplo, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), por ejemplo, en o sobre un sustrato tal como colágeno de la placenta, por ejemplo, o MATRIGEL™ durante al menos 4 días y hasta 14 días.

En ciertas realizaciones, en el presente documento, se proporciona una célula que expresa, o una población de células, en la que al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las células de dicha población aislada de células son células adherentes derivadas del amnios que expresan ARN para una o más de, o todas de, ACTA2 (actina, alfa 2, músculo liso, aorta), ACTC1 (actina, alfa, músculo cardíaco 1), ADAMTS1 (metaloendopeptidasa ADAM con motivo de trombospondina de tipo 1, 1), AMOT (angiomotina), ANG (angiogenina), ANGPT1 (angiopoyetina 1), ANGPT2, ANGPTL1 (angiopoyetina de tipo 1), ANGPTL2, ANGPTL4, BAI1 (inhibidor de la angiogénesis específica del cerebro 1), c-myc, CD44, CD140a, CD140b, CD200, CD202b, CD304, CD309, CEACAM1 (molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1), CHGA (cromogranina A), COL15A1 (colágeno, tipo XV, alfa 1), COL18A1 (colágeno, tipo XVIII, alfa 1), COL4A1 (colágeno, tipo IV, alfa 1), COL4A2 (colágeno, tipo IV, alfa 2), COL4A3 (colágeno, tipo IV, alfa 3), conexina-43, CSF3 (factor estimulante de colonias 3 (granulocito), CTGF (factor de crecimiento de tejido conjuntivo), CXCL12 (ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 12 (factor derivado de células estromales 1)), CXCL2, DNMT3B (ADN (citosin-5-)-metiltransferasa 3 beta), ECGF1 (timidina fosforilasa), EDG1 (gen de diferenciación de las células endoteliales 1), EDIL3 (repeticiones similares a EGF y dominios de tipo discoidina 3), ENPP2 (ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2), EPHB2 (receptor de EPH B2), FBLN5 (FIBULIN 5), F2 (factor de coagulación II (trombina)), FGF1 (factor de crecimiento de fibroblastos ácido), FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos básico), FIGF (factor de crecimiento inducido por c-fos (factor de crecimiento endotelial vascular D)), FLT4 (tirosina quinasa relacionada con fms 4), FN1 (fibronectina 1), FST (folistatina), FOXC2 (proteína forkhead box C2 (MFH-1, proteína mesenquimal forkhead 1)), folistatina, galectina-1, GRN (granulina), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), HEY1 (proteína vellosa/potenciadora de la división relacionada con el motivo YRPW 1), HSPG2 (proteoglicano de sulfato de heparán 2), IFNB1 (interferón, beta 1, fibroblasto), IL8 (Interleucina 8), IL12A, ITGA4 (integrina, alfa 4; CD49d), ITGAV (integrina, alfa V), ITGB3 (integrina, beta 3), KLF4 (factor de tipo Kruppel 4), MDK (midkina), MMP-2 (metaloproteasa matricial 2), MYOZ2 (miozenina 2), NRP2 (neuropilina 2), PDGFB (factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\beta$ ), PF4 (factor plaquetario 4), PGK1 (fosfoglicerato quinasa 1), PROX1 (Homeobox Prospero 1), PTN (pleiotrofina), SEMA3F (semoforina 3F), SERPINB5 (inhibidor de la serpin peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 5), SERPINC1, SERPINF1, TIMP2 (inhibidor tisular de las metaloproteinasas 2), TIMP3, TGFA (factor de crecimiento transformante alfa), TGF $\beta$ 1, THBS1 (trombospondina 1), THBS2, TIE1 (dominios 1 de tipo tirosina quinasa con inmunoglobulina y EGF), TNF (factor de necrosis tumoral), TNNC1 (troponina C, tipo 1), TNNT2, TNFSF15 (superfamilia de factores de necrosis tumoral (ligando), miembro 15), VASH1 (vasohibina 1), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), VEGFB, VEGFC y/o VEGFR1/FLT1 (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1).

Cuando se usan células humanas, las denominaciones de los genes a lo largo del presente documento se refieren a secuencias humanas, y, como es bien conocido para los expertos en la materia, las secuencias representativas se pueden encontrar en la literatura, o en GenBank. Las sondas de las secuencias se pueden determinar mediante las secuencias que se encuentran a disposición del público o a través de fuentes comerciales, por ejemplo, las sondas TAQMAN<sup>®</sup> o la matriz de angiogénesis TAQMAN<sup>®</sup> específicas (Applied Biosystems, ref. 4378710).

En ciertas realizaciones, en el presente documento, se proporciona una célula que expresa, o una población de células, en la que al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las células de dicha población aislada de células son células adherentes derivadas del amnios que expresan CD49d, Conexina-43, HLA-ABC, Beta 2-microglobulina, CD349, CD318, PDL1, CD106, galectina-1, precursor de ADAM 17 (dominio 17 de desintegrina A y metaloproteinasas) (enzima convertora del TNF-alfa) (TNF-alfa convertasa), precursor angiotensinógeno, filamina A (filamina alfa) (filamina 1) (proteína de unión a la actina endotelial) (ABP-280) (filamina no muscular), alfa-actinina 1 (isoforma citoesquelética de la actinina alfa) (alfa-actinina 1 no muscular) (proteína de entrecruzamiento con F-actina), precursor de la proteína 2 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (Megalina) (glicoproteína 330) (gp330), tipos I y II del receptor neutralizante de macrófagos (receptor I y II de LDL acetilado de macrófagos), precursor de tipo IIB del receptor de activina (ACTR-IIB), proteína Wnt-9, proteína ácida fibrilar glial, astrocitos (GFAP), proteína C de unión a la miosina, de tipo cardíaco (MyBP-C cardíaca) (proteína C, isoforma cardíaca muscular) y/o cadena pesada de la miosina, de tipo A no muscular (cadena pesada de la miosina celular, tipo A) (cadena pesada A miosina no muscular) (NMMHC-A), detectable por inmunolocalización.

En ciertas realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios, o la población de células que comprende células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo, en la que al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las células en dicha población aislada de células son células adherentes derivadas del amnios, secretan una o más, o todas, de VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, Folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, Galectina-1, por ejemplo, en medio de cultivo en el que se cultivan la célula o las células.

En otra realización, en el presente documento, se proporciona una población de células, por ejemplo, una población de células adherentes derivadas del amnios, o una población de células en la que al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las células de dicha población aislada de células son células adherentes derivadas del amnios que expresan micro ARN (miARN) a un nivel más alto que las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, comprendiendo dichos miARN uno o más, o todos, de miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92 y/o miR-296. En otra realización, en el presente documento, se proporciona una población de células, por ejemplo, una población de células adherentes derivadas del amnios, o una población de células en la que al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las células de dicha población



aislada de células son células adherentes derivadas del amnios que expresan uno o más de, o todos, los micro ARN (miARN) a un nivel más bajo que las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, comprendiendo dichos miARN uno o más, o todos, miR-20a, miR-20b, miR-221, miR-222, miR-15b y/o miR-16. En ciertas realizaciones, las AMDAC, o las poblaciones de AMDAC, expresan uno o más, o todos, de los miARN angiogénicos miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, (miembros del agrupamiento de miARN angiogénicos 17-92), miR-296, miR-221, miR-222, miR-15b y/o miR-16.

En una realización, en el presente documento, se proporcionan células adherentes derivadas del amnios aisladas, en las que dichas células se adhieren al plástico de cultivo tisular, en la que dichas células son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y CD49f<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD117<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y en la que dichas células: (a) expresan una o más de CD9, CD10, CD44, CD54, CD98, CD200, Tie-2, TEM-7, VEGFR1/Flt-1 o VEGFR2/KDR (CD309), según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; (b) carecen de la expresión de CD31, CD34, CD38, CD45, CD133, CD143, CD144, CD146, CD271, CXCR4, HLA-G o VE-cadherina, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, la citometría de flujo; (c) carecen de la expresión de SOX2, según lo determinado mediante RT-PCR; (d) expresan ARNm para ACTA2, ADAMTS1, AMOT, ANG, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL1, ANGPTL2, ANGPTL4, BAI1, c-myc, CD44, CD140a, CD140b, CD200, CD202b, CD304, CD309, CEACAM1, CHGA, COL15A1, COL18A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, Conexina-3, CSF3, CTGF, CXCL12, CXCL2, DNMT3B, ECGF1, EDG1, EDIL3, ENPP2, EPHB2, FBLN5, F2, FGF1, FGF2, FIGF, FLT4, FN1, FST, FOXC2, Galectina-1, GRN, HGF, HEY1, HSPG2, IFNB1, IL8, IL12A, ITGA4, ITGAV, ITGB3, KLF-4, MDK, MMP2, MYOZ2, NRP2, PDGFB, PF4, PGK1, PROX1, PTN, SEMA3F, SERPINB5, SERPINC1, SERPINF1, TGFA, TGFB1, THBS1, THBS2, TIE1, TIMP2, TIMP3, TNF, TNNC1, TNNT2, TNFSF15, VASH1, VEGF, VEGFB, VEGFC o VEGFR1/FLT1; (e) produce una o más de las proteínas CD49d, Conexina-43, HLA-ABC, beta 2-microglobulina, CD349, CD318, PDL1, CD106, Galectina-1, ADAM 17, precursor de angiotensinógeno, filamina A, alfa-actinina 1, megalina, receptor I y II de LDL acetilado de macrófagos, precursor de tipo IIB del receptor de activina, proteína Wnt-9, proteína ácida fibrilar glial, astrocitos, proteína C de unión a la miosina o cadena pesada de miosina, tipo A no muscular; (f) secretan VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, Folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR o Galectina-1 en medio de cultivo en el que crecen las células; (g) expresan los micro ARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92 o miR-296 a un nivel superior a un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea; (h) expresan los micro ARN miR-20a, miR-20b, miR-221, miR-222, miR-15b o miR-16 a un nivel inferior a un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea; (i) expresan los miARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, miR-296, miR-221, miR-222, miR-15b y/o miR-16; y/o (j) expresan mayores niveles de CD202b, IL-8 o VEGF cuando se cultivan en O<sub>2</sub> a menos de aproximadamente 5 % en comparación con la expresión de CD202b, IL-8 o VEGF cuando se cultivan en O<sub>2</sub> a 21 %.

En una realización más específica, las células adherentes derivadas del amnios aisladas son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y CD49f<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD200<sup>+</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y (a) expresan CD9, CD10, CD44, CD54, CD98, CD200, Tie-2, TEM-7, VEGFR1/Flt-1 y VEGFR2/KDR (CD309), según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; (b) carecen de la expresión de CD31, CD34, CD38, CD45, CD133, CD143, CD144, CD146, CD271, CXCR4, HLA-G y VE-cadherina, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; (c) carecen de la expresión de SOX2, según lo determinado mediante RT-PCR; (d) expresan ARNm para ACTA2, ADAMTS1, AMOT, ANG, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL1, ANGPTL2, ANGPTL4, BAI1, c-myc, CD44, CD140a, CD140b, CD200, CD202b, CD304, CD309, CEACAM1, CHGA, COL15A1, COL18A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, Conexina-3, CSF3, CTGF, CXCL12, CXCL2, DNMT3B, ECGF1, EDG1, EDIL3, ENPP2, EPHB2, FBLN5, F2, FGF1, FGF2, FIGF, FLT4, FN1, FST, FOXC2, Galectina-1, GRN, HGF, HEY1, HSPG2, IFNB1, IL8, IL12A, ITGA4, ITGAV, ITGB3, KLF-4, MDK, MMP2, MYOZ2, NRP2, PDGFB, PF4, PGK1, PROX1, PTN, SEMA3F, SERPINB5, SERPINC1, SERPINF1, TGFA, TGFB1, THBS1, THBS2, TIE1, TIMP2, TIMP3, TNF, TNNC1, TNNT2, TNFSF15, VASH1, VEGF, VEGFB, VEGFC y VEGFR1/FLT1, según lo determinado mediante RT-PCR; (e) expresan una o más de CD49d, Conexina-43, HLA-ABC, beta 2-microglobulina, CD349, CD318, PDL1, CD106, Galectina-1, ADAM 17, precursor de angiotensinógeno, filamina A, alfa-actinina 1, megalina, receptor I y II de LDL acetilado de macrófagos, precursor de tipo IIB del receptor de activina, proteína Wnt-9, proteína ácida fibrilar glial, astrocitos, proteína C de unión a la miosina y/o cadena pesada de miosina, tipo A no muscular; (f) secretan VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, Folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR y/o Galectina-1 en medio de cultivo en el que crecen las células; (g) expresan micro los ARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92 y miR-296 a un nivel superior a un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea; (h) expresan los micro ARN miR-20a, miR-20b, miR-221, miR-222, miR-15b y miR-16 a un nivel inferior a un número equivalente de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea; (i) expresan los miARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, miR-296, miR-221, miR-222, miR-15b y miR-16; o (j) expresan mayores niveles de CD202b, IL-8 y VEGF cuando se cultivan en O<sub>2</sub> a menos de aproximadamente 5 % en comparación con la expresión de CD202b, IL-8 y/o VEGF en O<sub>2</sub> a 21 %. Además, en el presente documento, se proporcionan poblaciones de células que comprenden AMDAC, por ejemplo, poblaciones de AMDAC que tienen una o más de las características anteriormente mencionadas.

En otras realizaciones específicas, la población de células que comprende células angiogénicas derivadas del amnios segrega uno o más factores angiogénicos y, de ese modo, induce a las células endoteliales humanas a migrar en un ensayo *in vitro* de curación de heridas. En otras realizaciones específicas, la población de células que

comprende las células adherentes derivadas del amnios induce la maduración, la diferenciación o la proliferación de las células humanas endoteliales, células progenitoras endoteliales, los miocitos o los mioblastos.

5 En otra realización, cualquiera de las células adherentes derivadas del amnios anteriores, o poblaciones de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios, absorben la lipoproteína de baja densidad (LDL) acetilada cuando se cultivan en presencia de proteínas de matriz extracelular, por ejemplo, colágeno de tipo I o IV, y/o uno o más factores angiogénicos, por ejemplo, VEGF, EGF, PDGF o bFGF, por ejemplo, sobre un sustrato tal como colágeno de placenta o MATRIGEL™.

10 En otra realización, las AMDAC están comprendidas dentro de una población de células. En realizaciones específicas de dichas realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios se adhieren al plástico de cultivo tisular, son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y son VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> o VE-cadherina<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En realizaciones específicas, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células de dicha población de células son células derivadas del amnios que son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> o VE-cadherina<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células de dicha población son células derivadas del amnios que son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y VE-cadherina<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dichas células que son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR y VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> o VE-cadherina<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, no expresan CD34, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, tras la exposición a 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En otra realización específica, dichas células también son VE-cadherina<sup>-</sup>.

25 En una realización específica, dichas células derivadas del amnios que son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> o VE-cadherina<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, forma brotes o estructuras tubulares cuando dicha población de células se cultiva en presencia de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

30 Las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento presentan las características anteriores, por ejemplo, combinaciones de marcadores de superficie celular y/o perfiles de expresión génica, en cultivo primario, o durante la proliferación en un medio adecuado para el cultivo de células madre. Dicho medio incluye, por ejemplo, medio que comprende DMEM-LG de 1 a 100 % (Gibco), MCDB-201 de 1 a 100 % (Sigma), suero de ternera fetal de 1 a 10 % (FCS) (Hyclone Laboratories), de 0,1 a 5 veces de insulina-transferrina-selenio (ITS, Sigma), de 0,1 a 5 veces de ácido linolénico-albúmina de suero bovino (LA-BSA, Sigma), dexametasona 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-15</sup> M (Sigma), fosfato 2 de ácido ascórbico 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-10</sup> M (Sigma), de 1 a 50 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), (R & D Systems), de 1 a 50 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (R & D Systems) y 100 U de penicilina/1000 U de estreptomina. En una realización específica, el medio comprende DMEM-LG a 60 % (Gibco), MCDB-201 a 40 % (Sigma), suero de ternera fetal a 2 % (FCS) (Hyclone Laboratories), 1 x insulina-transferrina-selenio (ITS), 1 x ácido linolénico-albúmina de suero bovino (LA-BSA), dexametasona 10<sup>-9</sup> M (Sigma), fosfato 2 de ácido ascórbico 10<sup>-4</sup> M (Sigma), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (R & D Systems), 10 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (R & D Systems) y 100 U de penicilina/1.000 U de estreptomina. Más adelante, se describen otros medios adecuados.

45 Las poblaciones aisladas de células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento pueden comprender aproximadamente, al menos aproximadamente, o no más de aproximadamente, 1 x 10<sup>5</sup>, 5 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>6</sup>, 5 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>7</sup>, 5 x 10<sup>7</sup>, 1 x 10<sup>8</sup>, 5 x 10<sup>8</sup>, 1 x 10<sup>9</sup>, 5 x 10<sup>9</sup>, 1 x 10<sup>10</sup>, 5 x 10<sup>10</sup>, 1 x 10<sup>11</sup> o más células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo, en un recipiente. En diversas realizaciones, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células de las poblaciones de células aisladas proporcionadas en el presente documento son células adherentes derivadas del amnios. Es decir, una población de células adherentes derivadas del amnios aisladas pueden comprender, por ejemplo, tanto como 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % de células no AMDAC. En otras realizaciones específicas, al menos 25 %, 35 %, 45 %, 50 %, 60 %, 75 %, 85 % o más de las células de la población aislada de células que comprende células adherentes derivadas del amnios no son OCT-4<sup>+</sup>

55 Las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento se pueden cultivar en un sustrato. En diversas realizaciones, el sustrato puede ser cualquier superficie sobre la que se pueda realizar el cultivo y/o la selección de células adherentes derivadas del amnios. Por lo general, el sustrato es de plástico, por ejemplo, placa de plástico de cultivo tisular o placa de plástico de múltiples pocillos. El plástico de cultivo tisular se puede tratar, recubrir o imprimir con una biomolécula o un agente mimético sintético, por ejemplo, CELLSTART™, sustrato de ACF MESENCULT™, ornitina o polilisina, o una proteína de matriz extracelular, por ejemplo, colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina o similares.

60 Las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento, y las poblaciones de dichas células, se pueden aislar a partir de una o más placentas. Las células derivadas del amnios aisladas se pueden

cultivar y expandir para producir poblaciones de dichas células. Las poblaciones de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios también se pueden cultivar y expandir para producir poblaciones de células adherentes derivadas del amnios.

- 5 En ciertas realizaciones, las AMDAC que presentan cualquiera de los marcadores y/o las características de expresión génica anteriores se han hecho pasar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces, o más. En otras ciertas realizaciones, las AMDAC que presentan cualquiera de los marcadores y/o características de expresión génica anteriores se han duplicado en cultivo al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o al menos 50 veces, o más.
- 10 En una realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son negativas para la telomerasa, según lo medido mediante ensayos de RT-PCR y/o TRAP. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento no expresan ARNm para la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), según lo determinado mediante RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son NANOG<sup>+</sup>, según lo medido por RT-PCR. En otra realización específica, las AMDAC
- 15 descritas en el presente documento no expresan ARNm para NANOG según lo determinado mediante RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos. En una realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento son negativas para (la región determinante del sexo Y)-box 2 (SOX2). En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento no expresan ARNm para SOX2 según lo determinado mediante RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos. En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento no son
- 20 osteogénicas según lo medido mediante un ensayo de fenotipo osteogénico (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.1 que se presenta más adelante). En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento no son condrogénicas según lo medido mediante un ensayo de potencial condrogénico (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.2 que se presenta más adelante). En otra realización específica, las AMDAC descritas en el presente documento no son osteogénicas según lo medido mediante un ensayo de fenotipo osteogénico (véase, por ejemplo, el apartado
- 25 6.3.1 que se presenta más adelante) y no son condrogénicas según lo medido mediante un ensayo de potencial condrogénico (véase, por ejemplo, el apartado 6.3.1 que se presenta más adelante).

Las AMDAC pueden presentar una o más de las características descritas en el presente documento, según lo determinado mediante RT-PCR, como se demuestra en la Tabla 3. Por ejemplo, las AMDAC pueden presentar una o más de dichas características cuando se aíslan y se cultivan según lo descrito en el apartado 5.6 que se presenta

30 más adelante.

Tabla 3

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
ACTA2	X	
ACTC1	X	
ADAMTS1	X	
AMOT	X	
ANG	X	
ANGPT1	X	
ANGPT2	X	
ANGPT4		X
ANGPTL1	X	
ANGPTL2	X	
ANGPTL3		X
ANGPTL4	X	
BAI1	X	

ES 2 599 331 T3

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
BGLAP		X
c-myc	X	
CD31		X
CD34		X
CD44	X	
CD140a	X	
CD140b	X	
CD200	X	
CD202b	X	
CD304	X	
CD309 (VEGFR2/KDR)	X	
CDH5		X
CEACAM1	X	
CHGA	X	
COL15A1	X	
COL18A1	X	
COL4A1	X	
COL4A2	X	
COL4A3	X	
Conexina-43	X	
CSF3	X	
CTGF	X	
CXCL10		X
CXCL12	X	
CXCL2	X	
DLX5		X
DNMT3B	X	
ECGF1	X	
EDG1	X	
EDIL3	X	

ES 2 599 331 T3

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
ENPP2	X	
EPHB2	X	
F2	X	
FBLN5	X	
FGA		X
FGF1	X	
FGF2	X	
FGF4		X
FIGF	X	
FLT3		X
FLT4	X	
FN1	X	
FOXC2	X	
Folistatina	X	
Galectina-1	X	
GRN	X	
HEY1	X	
HGF	X	
HLA-G		X
HSPG2	X	
IFNB1	X	
IFNG		X
IL-8	X	
IL-12A	X	
ITGA4	X	
ITGAV	X	
ITGB3	X	
KLF-4	X	
LECT1		X
LEP		X

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
MDK	X	
MMP-13		X
MMP-2	X	
MYOZ2	X	
NANOG		X
NESTIN		X
NRP2	X	
PDGFB	X	
PF4	X	
PGK1	X	
PLG		X
POU5F1 (OCT-4)		X
PRL		X
PROK1		X
PROX1	X	
PTN	X	
SEMA3F	X	
SERPINB5	X	
SERPINC1	X	
SERPINF1	X	
SOX2		X
TERT		X
TGFA	X	
TGFB1	X	
THBS1	X	
THBS2	X	
TIE1	X	
TIMP2	X	
TIMP3	X	
TNF	X	

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
TNFSF15	X	
TNMD		X
TNNC1	X	
TNNT2	X	
VASH1	X	
VEGF	X	
VEGFB	X	
VEGFC	X	
VEGFR1/FLT-1	X	
XLKD1		X

5 Las AMDAC pueden presentar una o más de las características descritas en el presente documento según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, como se demuestra en la Tabla 4. Por ejemplo, las AMDAC pueden presentar una o más de dichas características cuando se aíslan y se cultivan según lo descrito en el apartado 5.6 que se presenta más adelante.

Tabla 4

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
CD6		X
CD9	X	
CD10	X	
CD31		X
CD34		X
CD44	X	
CD45		X
CD49b	X	
CD49c	X	
CD49d	X	
CD49f	X	
CD54	X	
CD68	X	
CD90	X	
CD98	X	

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
CD105	X	
CD117		X
CD133		X
CD143		X
CD144 (VE-cadherina)		X
CD146		X
CD166	X	
CD184		X
CD200	X	
CD202b	X	
CD271		X
CD304	X	
CD309 (VEGFR2/KDR)	X	
CD318	X	
CD349	X	
CytoK	X	
HLA-ABC+ B2 Micro+	X	
Cadena invariable + HLA-DR-DP-DQ+		X
PDL-1	X	

5 Las AMDAC pueden presentar una o más de las características descritas en el presente documento según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, inmunofluorescencia y/o inmunohistoquímica, como se demuestra en la Tabla 5. Por ejemplo, las AMDAC pueden presentar una o más de dichas características cuando se aíslan y se cultivan según lo descrito en el apartado 5.6 que figura más adelante.

Tabla 5

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
CD31		X
CD34		X
VEGFR2/KDR	X	
Conexina-43	X	
Galectina-1	X	



Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
TEM-7	X	

- 5 Las AMDAC pueden presentar una o más de las características descritas en el presente documento según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, proteómica de membrana, como se demuestra en la Tabla 6. Por ejemplo, las AMDAC pueden presentar una o más de dichas características cuando se aíslan y se cultivan según lo descrito en el apartado 5.6, que figura más adelante.

Tabla 6

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
Receptor de la activina de tipo IIB	X	
ADAM 17	X	
Alfa-actinina 1	X	
Angiotensinógeno	X	
Filamina A	X	
Receptor I y II de LDL acetilado de macrófagos	X	
Megalina	X	
Cadena pesada de miosina no muscular de tipo A	X	
Proteína C de unión a la miosina de tipo cardiaco	X	
Wnt-9	X	

- 10 Las AMDAC pueden presentar una o más de las características descritas en el presente documento según lo determinado mediante análisis secretómico, por ejemplo, ELISA, como se demuestra en la Tabla 7. Por ejemplo, las AMDAC pueden presentar una o más de estas características cuando se aíslan y se cultivan según lo descrito en el apartado 5.6 que se presenta más adelante.

Tabla 7

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
ANG	X	
EGF	X	
ENA-78	X	
FGF2	X	
Folistatina	X	

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
G-CSF	X	
GRO	X	
HGF	X	
IL-6	X	
IL-8	X	
Leptina	X	
MCP-1	X	
MCP-3	X	
PDGFB	X	
PLGF	X	
Rantes	X	
TGFB1	X	
Trombopoyetina	X	
TIMP1	X	
TIMP2	X	
uPAR	X	
VEGF	X	
VEGFD	X	

#### 5.4 POBLACIONES DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIO QUE COMPRENDEN OTROS TIPOS DE CÉLULAS

5 Las poblaciones de células aisladas que comprenden células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento pueden comprender un segundo tipo de célula, por ejemplo, células de la placenta que no derivan de células adherentes derivadas del amnios o, por ejemplo, células que no son células de la placenta. Por ejemplo, una población aislada de células adherentes derivadas del amnios puede comprender, por ejemplo, se puede combinar con, una población de un segundo tipo de células, en la que dicho segundo tipo de célula es, por ejemplo, células madre embrionarias, células sanguíneas (por ejemplo, sangre de la placenta, células sanguíneas de la placenta, sangre del cordón umbilical, células sanguíneas del cordón umbilical, sangre periférica, células de sangre periférica, células nucleadas de sangre de la placenta, sangre del cordón umbilical o sangre periférica, y similares), células madre aisladas de la sangre (por ejemplo, células madre aisladas de la sangre de la placenta, sangre del cordón umbilical o sangre periférica), células madre de la placenta (por ejemplo, las células madre de la placenta descritas en la patente de EE.UU. n.º 7.468.276, y en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2007/0275362, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad), células nucleadas de perfundido de la placenta, por ejemplo, células nucleadas totales de perfundido de la placenta, las células descritas y reivindicadas en la patente de EE.UU. n.º 7.638.141, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, células madre del cordón umbilical, poblaciones de células nucleadas derivadas de la sangre, células mesenquimales del estroma derivadas de la médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, células madre hematopoyéticas derivadas de la médula ósea, médula ósea en bruto, células madre (somáticas) de adulto, poblaciones de células madre contenidas dentro de los tejidos, células cultivadas, por ejemplo, células madre cultivadas, poblaciones de células completamente diferenciadas (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células musculares, células cardíacas, etc.), pericitos, y similares. En una realización específica, una población aislada de células que comprende células

10

15

20

adherentes derivadas del amnios comprende células madre de la placenta o células madre del cordón umbilical. En ciertas realizaciones en las que el segundo tipo de célula es sangre o células sanguíneas, se han retirado los eritrocitos de la población de células.

5 En una realización específica, el segundo tipo de célula es una célula madre hematopoyética. Dichas células madre hematopoyéticas pueden estar contenidas, por ejemplo, dentro de la sangre de la placenta sin procesar, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en las células nucleadas totales de la sangre de la placenta, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en una población aislada de células CD34<sup>+</sup> de la sangre de la placenta, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en la médula ósea sin procesar; en células nucleadas totales de la médula ósea; en una población aislada de células CD34<sup>+</sup> de la médula ósea, o similares.

10 En otra realización, el segundo tipo de célula es un tipo de células no embrionarias manipulado en cultivo para expresar marcadores de pluripotencia y funciones asociadas con las células madre embrionarias.

En realizaciones específicas de las anteriores poblaciones aisladas de células adherentes derivadas del amnios, cualquiera o ambas células adherentes derivadas del amnios y células de un segundo tipo son autólogas, o son alogénicas, a un receptor de las células.

15 Además, en el presente documento, se proporciona una composición que comprende células adherentes derivadas del amnios, y una pluralidad de células madre distintas de las células adherentes derivadas del amnios. En una realización específica, la composición comprende una célula madre que se obtiene a partir de una placenta, es decir, una célula madre de placenta, por ejemplo, células madre de placenta según lo descrito en las patentes de EE.UU. n.º 7.045.148; 7.255.879; y 7.311.905, y en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2007/0275362, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. En una realización específica, las células madre de la placenta son CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En una realización más específica, las células madre de la placenta son CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, las células madre de la placenta son CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, las células madre de la placenta son CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otras realizaciones específicas, dichas células madre de la placenta son CD200<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>; CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos embrioides en una población de células de la placenta que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo embriode; u OCT-4<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos embrioides en una población de células de la placenta que comprende la célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos embrioides; o cualquier combinación de las mismas. En una realización más específica, dichas células madre CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización más específica, dichas células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización más específica, dichas células madre CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otra realización más específica, dichas células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup> son CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otra realización más específica, dichas células madre CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización más específica, dichas células madre OCT-4<sup>+</sup> son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización más específica, las células madre de la placenta son de origen materno (es decir, tienen el genotipo materno). En otra realización más específica, las células madre de la placenta son de origen fetal (es decir, tienen el genotipo fetal).

40 En otra realización específica, la composición comprende células adherentes derivadas del amnios y células madre embrionarias. En otra realización específica, la composición comprende células adherentes derivadas del amnios y células estromales o madre mesenquimales, por ejemplo, células estromales o madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. En otra realización específica, la composición comprende células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea. En otra realización específica, la composición comprende células adherentes derivadas del amnios y células hematopoyéticas progenitoras, por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea, sangre fetal, sangre del cordón umbilical, sangre de la placenta y/o sangre periférica. En otra realización específica, la composición comprende células adherentes derivadas del amnios y células madre somáticas. En una realización más específica, dicha célula madre somática es una célula madre neuronal, una célula madre hepática, una célula madre pancreática, una célula madre endotelial, una célula madre cardíaca o una célula madre muscular.

50 En otras realizaciones específicas, el segundo tipo de células comprende aproximadamente, al menos, o no más de, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % de células de dicha población. En otras realizaciones específicas, las AMDAC de dicha composición comprenden al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de células de dicha composición. En otras realizaciones específicas, las células adherentes derivadas del amnios comprenden aproximadamente, al menos, o no más de, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o 45 % de células de dicha población. En otras realizaciones específicas, al menos 25 %, 35 %, 45 %, 50 %, 60 %, 75 %, 85 % o más de las células de dicha población no son OCT-4<sup>+</sup>.

60 Las células de una población aislada de células adherentes derivadas del amnios se pueden combinar con una pluralidad de células de otro tipo, por ejemplo, con una población de células madre, en una proporción de aproximadamente 100.000.000:1, 50.000.000:1, 20.000.000:1, 10.000.000:1, 5.000.000:1, 2.000.000:1, 1.000.000:1, 500.000:1, 200.000:1, 100.000:1, 50.000:1, 20.000:1, 10.000:1, 5.000:1, 2.000:1, 1.000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1,

20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:5.000; 1:10.000; 1:20.000; 1:50.000; 1:100.000; 1:500.000; 1:1.000.000; 1:2.000.000; 1:5.000.000; 1:10.000.000; 1:20.000.000; 1:50.000.000; o aproximadamente 1:100.000.000, comparando los números de células nucleadas totales de cada población. Las células de una población aislada de células adherentes derivadas del amnios también se pueden combinar con una pluralidad de células de una pluralidad de tipos de células.

### 5.5 CRECIMIENTO EN CULTIVO

El crecimiento de las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento, para cualquier célula de mamífero, depende en parte del medio seleccionado en particular para el crecimiento. En condiciones óptimas, las células adherentes derivadas del amnios normalmente se duplican en número en aproximadamente 24 horas. Durante el cultivo, las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento se adhieren a un sustrato en cultivo, por ejemplo, la superficie de un recipiente de cultivo tisular (por ejemplo, placa de plástico de cultivo tisular, plástico recubierto de fibronectina, y similares) y forman una monocapa. Por lo general, las células se establecen en cultivo en el plazo de 2 a 7 días después de la digestión del amnios. Proliferan a aproximadamente 0,4 a 1,2 duplicaciones de la población al día y pueden sufrir al menos de 30 a 50 duplicaciones de la población. Las células presentan un fenotipo de tipo célula mesenquimal/fibroblástica durante la subconfluencia y la expansión, y un aspecto cúbico/de adoquín al confluir, y la proliferación en cultivo se inhibe enormemente por el contacto. Las poblaciones de células adherentes derivadas del amnios pueden formar cuerpos embrionarios durante la expansión en cultivo. Las células adherentes derivadas del amnios se pueden cultivar en condiciones de normoxia o de hipoxia, por ejemplo, con O<sub>2</sub> a aproximadamente 0,1 % a O<sub>2</sub> a aproximadamente 21 %, por ejemplo, con O<sub>2</sub> a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 0,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 %.

### 5.6 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL OMNOS

Las células adherentes derivadas del amnios, y las poblaciones de células que comprenden las células adherentes derivadas del amnios, se pueden producir, por ejemplo, aislar de otras células o poblaciones de células, por ejemplo, a través de métodos particulares de digestión del tejido del amnios, opcionalmente seguida de la evaluación de las células resultantes o de la población de células para determinar la presencia o ausencia de marcadores, o combinaciones de marcadores, las características de las células adherentes derivadas del amnios, o mediante la obtención de células del amnios y la selección basada en marcadores característicos de células adherentes derivadas del amnios.

Las células adherentes derivadas del amnios, y las poblaciones aisladas de células que comprenden las células adherentes derivadas del amnios, proporcionadas en el presente documento se pueden producir mediante, por ejemplo, la digestión del tejido del amnios seguida de la selección de las células adherentes. En una realización, por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios aisladas o una población aislada de células que comprende células adherentes derivadas del amnios, se puede producir mediante (1) la digestión de tejido del amnios con una primera enzima para disociar las células de la capa epitelial del amnios de las células de la capa mesenquimal del amnios; (2) seguidamente, digerir la capa mesenquimal del amnios con una segunda enzima para formar una suspensión de una sola célula; (3) cultivar células de dicha suspensión de una sola célula en una superficie de cultivo tisular, por ejemplo, plástico de cultivo tisular; y (4) seleccionar células que se adhieren a dicha superficie tras un cambio de medio, produciendo de este modo una población aislada de células que comprende células adherentes derivadas del amnios. En una realización específica, dicha primera enzima es tripsina. En una realización más específica, dicha tripsina se usa a una concentración de tripsina a 0,25 % (p/v), en de 5 a 20, por ejemplo, 10 mililitros de solución por gramo de tejido del amnios que se va a digerir. En otra realización más específica, se deja que dicha digestión con tripsina se produzca durante aproximadamente 15 minutos a 37 °C y se repite hasta tres veces. En otra realización específica, dicha segunda enzima es colagenasa. En una realización más específica, dicha colagenasa se usa a una concentración entre 50 y 500 U/l en 5 ml por gramo de tejido del amnios que se va a digerir. En otra realización más específica, se deja que dicha digestión con colagenasa se produzca durante aproximadamente 45-60 minutos a 37 °C. En otra realización específica, la suspensión de una sola célula formada tras la digestión con colagenasa se filtra a través, por ejemplo, de un filtro de 75 µM-150 µM entre la etapa (2) y la etapa (3). En otra realización específica, dicha primera enzima es tripsina, y dicha segunda enzima es colagenasa.

Una población aislada de células que comprende células adherentes derivadas del amnios puede, en otra realización, obtenerse mediante la selección de las células del amnios, por ejemplo, células obtenidas mediante la digestión de tejido del amnios según lo descrito en otra parte del presente documento, que muestran una o más características de una célula adherente derivada del amnios. En una realización, por ejemplo, una población de células se produce mediante un método que comprende la selección de células identificadoras que son (a) negativas para OCT-4, según lo determinado mediante RT-PCR, y (b) positivas para uno o más de VEGFR2/KDR, CD9, CD54, CD105, CD200, según lo determinado o seleccionado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En una realización específica, dichas células amnióticas son, además, VE-cadherina<sup>-</sup>. En una realización específica, se produce una población de células mediante la selección de células del amnios que son (a) negativas para OCT-4, según lo determinado mediante RT-PCR, y VE-cadherina, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y (b) positivas para cada uno de VEGFR2/KDR, CD9, CD54, CD105, CD200, según lo

determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo; y el aislamiento de dichas células a partir de otras células para formar una población de células. En ciertas realizaciones, la selección por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, se lleva a cabo antes de la selección por RT-PCR. En otra realización específica, dicha selección comprende la selección de células que no expresan el marcador celular CD34 después del cultivo durante 4 a 21 días en presencia de 1 a 100 ng/ml de VEGF.

En otra realización, por ejemplo, se produce una población de células mediante un método que comprende seleccionar células del amnios que se adhieren al plástico de cultivo tisular y son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> y VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En una realización específica, se produce una población de células mediante un método que comprende la selección de células del amnios que son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado mediante RT-PCR, y VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup>, VEGFR2/KDR<sup>+</sup> y HLA-G<sup>-</sup>, según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo. En otra realización específica, dicha población de células se produce mediante la selección de las células del amnios que son, además, uno o más, o todos, de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup> y/o CXCR4<sup>-</sup> (receptor 4 de la quimiocina (motivo C-X-C)) según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y aislar las células de células que no muestran una o más de estas características. En otra realización específica, dicha población de células se produce mediante la selección de células del amnios que, además, son VE-cadherina<sup>-</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y el aislamiento de las células de células que son VE-cadherina<sup>+</sup>. En otra realización específica, dicha población de células se produce mediante la selección de células del amnios que son, además, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> según lo determinado mediante inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, y el aislamiento de las células de células que son CD105<sup>-</sup> o CD200<sup>-</sup>. En otra realización específica, dicha célula no expresa CD34 según lo detectado por inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, tras la exposición a 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días.

En la selección de las células, no es necesario ensayar toda una población de células para determinar las características específicas de las células adherentes derivadas del amnios. En cambio, se pueden ensayar una o más partes alícuotas de células (por ejemplo, aproximadamente 0,5 % - 2 %) de una población de células para determinar dichas características, y los resultados se pueden atribuir al resto de las células de la población.

Se puede confirmar que las células seleccionadas son las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento mediante el cultivo de una muestra de las células (por ejemplo, aproximadamente 10<sup>4</sup> a aproximadamente 10<sup>5</sup> células) sobre un sustrato, por ejemplo, MATRIGEL™, durante 4 a 14, por ejemplo, 7 días en presencia de VEGF (por ejemplo, aproximadamente 50 ng/ml), y la inspección visual de las células para determinar la aparición de brotes y/o redes celulares.

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden seleccionar mediante los marcadores anteriores usando cualquier método de selección de células conocido en la técnica. Por ejemplo, las células adherentes se pueden seleccionar mediante un anticuerpo o anticuerpos contra uno o más marcadores de superficie celular, por ejemplo, en la inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo o FACS. La selección puede llevarse a cabo usando anticuerpos en combinación con perlas magnéticas. Los anticuerpos que son específicos de ciertos marcadores son conocidos en la técnica y se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, anticuerpos contra CD9 (Abcam); CD54 (Abcam); CD105 (Abcam; Biodesign International, Saco, ME, etc.); CD200 (Abcam) citoqueratina (Sigma-Aldrich). Los anticuerpos frente a otros marcadores también están disponibles en el mercado, por ejemplo, CD34, CD38 y CD45, que están disponibles, por ejemplo, en StemCell Technologies o Biodesign International. Se pueden obtener en el mercado cebadores para secuencias de OCT-4 adecuadas para la RT-PCR, por ejemplo, de Millipore o Invitrogen, o se pueden derivar fácilmente a partir de la secuencia humana en n° de acceso del GenBank DQ486513.

A continuación, se proporcionan métodos detallados de la obtención de la placenta y de tejido del amnios de la placenta, y de tratamiento de dicho tejido para obtener células adherentes derivadas del amnios.

#### **5.6.1 Composición de extracción de células**

En general, las células se pueden obtener del amnios de una placenta de mamífero, por ejemplo, una placenta humana, usando una solución fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una composición de extracción de células. En ciertas realizaciones, la composición de extracción de células previene o suprime la apoptosis, previene o suprime la muerte celular, la lisis, la descomposición y similares. En la publicación de solicitud de patente de EE.UU. relacionada n.º 2007/0190042, titulada "Medio mejorado para la extracción de células madre de la placenta y conservación de los órganos", cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, se describe detalladamente una composición de extracción de células.

La composición de extracción de células puede comprender cualquier solución fisiológicamente aceptable adecuada para la extracción y/o el cultivo de células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo, una solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, solución de Krebs, solución de Krebs modificada, solución de Eagle, NaCl a 0,9 % etc.), un medio de cultivo (por ejemplo, DMEM, H.DMEM, etc.), y similares, con o sin la adición de un

componente de tamponamiento, por ejemplo, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazintanosulfónico (HEPES).

La composición de extracción de células puede comprender uno o más componentes que tienden a conservar las células, por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios, es decir, a evitar que las células mueran, o retrasar la muerte de las células, reducir el número de células que mueren de una población de células, o similares, desde el momento de la extracción al momento del cultivo. Dichos componentes pueden ser, por ejemplo, un inhibidor de la apoptosis (por ejemplo, un inhibidor de caspasa o inhibidor de JNK); un vasodilatador (por ejemplo, sulfato de magnesio, un fármaco antihipertensivo, péptido natriurético atrial (ANP), adrenocorticotropina, hormona liberadora de corticotropina, nitroprusiato de sodio, hidralazina, adenosina trifosfato, adenosina, indometacina o sulfato de magnesio, un inhibidor de la fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de la necrosis (por ejemplo, 2-(1*H*-Indol-3-il)-3-pentilamino-maleimida, pirrolidina ditiocarbamato o clonazepam); un inhibidor de TNF- $\alpha$ ; y/o un perfluorocarbono portador de oxígeno (por ejemplo, bromuro de perfluorocetilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

La composición de extracción de células puede comprender una o más enzimas que degraden el tejido, por ejemplo, una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una RNasa o una DNasa, o similares. Dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, colagenasas (por ejemplo, colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASE™, hialuronidasa, y similares. El uso de composiciones de extracción de células que comprenden enzimas para digerir tejido se analiza con más detalle a continuación.

La composición de extracción de células puede comprender una cantidad bactericida o bacteriostáticamente eficaz de un antibiótico. En ciertas realizaciones no limitantes, el antibiótico es un macrólido (por ejemplo, tobramicina), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxil), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (por ejemplo, penicilina V) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacino), una tetraciclina, un estreptomocina, etc. En una realización particular, el antibiótico es activo contra las bacterias Gram (+) y/o Gram (-), por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y similares.

La composición de extracción de células también puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM); iones de magnesio (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); una macromolécula de peso molecular superior a 20.000 Da, en una realización, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad endotelial y la viabilidad celular (por ejemplo, un coloide sintético o de origen natural, un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente a aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (por ejemplo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presentes a aproximadamente 25  $\mu$ M a aproximadamente 100  $\mu$ M); un agente reductor (por ejemplo, N-acetilcisteína presente a aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que impide la entrada del calcio en las células (por ejemplo, verapamil presente a aproximadamente 2  $\mu$ M a aproximadamente 25  $\mu$ M); nitroglicerina (por ejemplo, aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 0,2 g/l); un anticoagulante, en una realización, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de la sangre residual (por ejemplo, heparina o hirudina presentes a una concentración de aproximadamente 1.000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (por ejemplo, amilorida, etil-isopropil-amilorida, hexametilen-amilorida, dimetil-amilorida o isobutil-amilorida presente a aproximadamente 1,0  $\mu$ M a aproximadamente 5  $\mu$ M).

Las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento también se pueden extraer, por ejemplo, durante y tras la digestión según lo descrito a continuación, en un tampón fisiológicamente aceptable simple, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, una solución de NaCl a 0,9 %, medio de cultivo celular, o similares .

#### 5.6.2 Extracción y tratamiento de la placenta

En general, una placenta humana se extrae poco después de su expulsión tras el nacimiento, o después de, por ejemplo, una cesárea. En una realización preferida, la placenta se extrae de una paciente con consentimiento previo informado y tras la obtención de un historial médico completo de la paciente y en relación con la placenta. Preferentemente, el historial médico continúa tras el parto. Dicho historial médico se puede usar para coordinar el uso posterior de la placenta o de las células extraídas de la misma. Por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios humanas se pueden usar, a la luz del historial médico, para la medicina personalizada para el bebé, o un pariente cercano, asociados con la placenta, o para los padres, hermanos u otros parientes del bebé.

Antes de la extracción de las células adherentes derivadas del amnios, se retiran la sangre del cordón umbilical y la sangre de la placenta. En ciertas realizaciones, tras el parto, se extrae la sangre del cordón umbilical de la placenta. La placenta se puede someter a un proceso convencional de extracción de sangre del cordón umbilical. Por lo general, se usa una aguja o cánula, con ayuda de la gravedad, para extraer la sangre de la placenta (véase, por ejemplo, Anderson, patente de EE.UU. n° 5.372.581; Hessel *et al.*, patente de EE.UU. n° 5.415.665). En general, la aguja o cánula se colocan en la vena umbilical, y se puede masajear la placenta suavemente para ayudar a drenar la sangre desde el cordón umbilical de la placenta. Dicha extracción de sangre del cordón umbilical se puede realizar

a nivel comercial, por ejemplo, LifeBank USA, Cedar Knolls, N. J., ViaCord, Cord Blood Registry y Cryocell. Preferentemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional para minimizar la alteración del tejido durante la extracción de la sangre de cordón.

- 5 Por lo general, una placenta se transporta desde el paritorio a otra ubicación, por ejemplo, a un laboratorio, para la extracción de la sangre del cordón y la extracción de las células mediante, por ejemplo, la disociación del tejido. La placenta se transporta preferentemente en un dispositivo de transporte estéril, aislado térmicamente, (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28 °C), por ejemplo, colocando la placenta, con el cordón umbilical proximal sujeto con una pinza, en una bolsa de plástico con cierre de cremallera estéril, que luego se coloca en un recipiente aislado. En otra realización, la placenta se transporta en un kit de extracción de sangre del cordón esencialmente según lo descrito en la patente de EE.UU. n.º 7.147.626. Preferentemente, la placenta se lleva al laboratorio de 10 cuatro a veinticuatro horas después del parto. En ciertas realizaciones, el cordón umbilical proximal se sujeta, preferentemente en 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco de la placenta antes de la extracción de la sangre del cordón. En otras realizaciones, el cordón umbilical proximal se sujeta con una pinza tras la extracción de la sangre del cordón, pero antes del procesamiento adicional de la placenta.
- 15 La placenta, antes de la extracción de las células, puede almacenarse en condiciones estériles y a una temperatura de, por ejemplo, 4 a 25 °C (grados centígrados), por ejemplo, a temperatura ambiente. La placenta puede conservarse durante, por ejemplo, un período de cero a veinticuatro horas, hasta cuarenta y ocho horas, o más de cuarenta y ocho horas, antes de la perfusión de la placenta para eliminar cualquier resto de sangre del cordón. En una realización, la placenta se extrae de aproximadamente cero horas a aproximadamente dos horas después de la 20 expulsión. La placenta se puede almacenar en una solución anticoagulante a una temperatura de, por ejemplo, 4 a 25 °C (grados centígrados). Las soluciones anticoagulantes adecuadas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar una solución de citrato de sodio, heparina o warfarina sódica. En una realización preferida, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (por ejemplo, 1 % p/p en solución 1:1.000). La placenta exanguinada se almacena preferentemente durante no más de 36 horas antes de extraer las células.
- 25 Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 7.638.141, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, para información adicional con respecto a la extracción y el tratamiento de la placenta.

### **5.6.3 Alteración física y digestión enzimática del tejido del amnios**

- 30 En una realización, el amnios se separa del resto de la placenta, por ejemplo, mediante disección con un instrumento romo, por ejemplo, usando los dedos. El amnios se puede diseccionar, por ejemplo, en partes o segmentos de tejido, antes de la digestión enzimática y la extracción de células adherentes. Las células adherentes derivadas del amnios se pueden obtener de todo un amnios, o de un pequeño segmento del amnios, por ejemplo, un segmento del amnios que es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o aproximadamente 1.000 milímetros cuadrados de superficie.
- 35 En general, las células adherentes derivadas del amnios se pueden extraer de un amnios de placenta o de una parte del mismo, en cualquier momento en el plazo de aproximadamente los tres primeros días después de la expulsión, pero preferentemente a entre aproximadamente las 0 horas y 48 horas de la expulsión, o aproximadamente 8 horas y aproximadamente 18 horas después de la expulsión.
- 40 Las AMDAC se pueden aislar, por ejemplo, usando un método de aislamiento de dos etapas específico que comprende la digestión con tripsina seguida de la digestión con colagenasa. Por ejemplo, en el presente documento, se proporciona un método de aislamiento de células adherentes derivadas del amnios que comprende la digestión de una membrana amniótica o parte de la misma con tripsina, de modo que las células epiteliales se liberan de dicha membrana amniótica; la retirada de la membrana amniótica o parte de la misma de dichas células epiteliales; la digestión adicional de la membrana amniótica o parte de la misma con colagenasa. En una realización específica, la digestión de la membrana amniótica o parte de la misma con tripsina se repite al menos una vez. En otra realización 45 específica, la digestión de la membrana amniótica o parte de la misma con colagenasa se repite al menos una vez. En otra realización específica, la tripsina está a aproximadamente 0,1 %-1,0 % (concentración final). En una realización más específica, la tripsina está a aproximadamente 0,25 % (concentración final). En otra realización específica, la colagenasa está a aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 1.000 U/ml (concentración final). En una realización más específica, la colagenasa está a aproximadamente 125 U/ml (concentración final).
- 50 En una realización, por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios se pueden obtener de la siguiente manera. Se aísla membrana amniótica de la placenta a través de, por ejemplo, disección, luego se corta en segmentos de aproximadamente 0,254 cm x 0,254 cm (0,1" x 0,1") a aproximadamente 12,7 cm x 12,7 cm (5" x 5"), por ejemplo, 5,08 cm x 5,08 cm (2" x 2"), de tamaño. Se retira la monocapa epitelial de la parte fetal de la membrana amniótica por tripsinización, por ejemplo, tripsinización triple de la siguiente manera. Se colocan los segmentos de 55 membrana amniótica en un recipiente con solución de tripsina-EDTA (0,25 %) caliente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37°C). El volumen de la solución de tripsina puede variar de aproximadamente 5 ml por gramo de membrana amniótica a aproximadamente 50 ml por gramo de membrana amniótica. Se agita el recipiente durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, 15 minutos, manteniendo la temperatura constante. A continuación, se separan los segmentos de membrana

amniótica de la solución de tripsina mediante cualquier método apropiado, tal como la retirada manual de los segmentos del amnios o por filtración. La etapa de tripsinización se puede repetir al menos una vez más. En una realización, la etapa de tripsinización se repite dos veces (para la tripsinización triple) o tres veces (por la tripsinización cuádruple).

- 5 En una realización, tras la finalización de la tripsinización final, se vuelven a colocar de nuevo los segmentos de la membrana amniótica en solución de neutralización de tripsina caliente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C) (por ejemplo, en un volumen de aproximadamente 5 ml por gramo de membrana amniótica a aproximadamente 50 ml por gramo de membrana amniótica), tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS)/suero fetal bovino (FBS) a 10 %, PBS/FBS a 5 % o PBS/FBS a 3 %. Se agita el recipiente durante aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, 5, 10 o 15 minutos. Luego se separan los segmentos de membrana amniótica de la solución de neutralización de tripsina mediante cualquier método apropiado, tal como la retirada manual de los segmentos del amnios o por filtración. Se colocan los segmentos de membrana amniótica en el recipiente lleno con PBS caliente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C), pH de la solución 7,2 (por ejemplo, en un volumen de aproximadamente 5 ml por gramo de membrana amniótica a aproximadamente 50 ml por gramo de membrana amniótica). Se agita el recipiente durante aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, 5, 10 o 15 minutos. Entonces, se separan los segmentos de membrana amniótica del PBS según lo descrito anteriormente.

- Se colocan los segmentos de membrana amniótica en solución de digestión caliente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C). El volumen de solución de digestión puede variar de aproximadamente 5 ml por gramo de amnios a aproximadamente 50 ml por gramo de amnios. Las soluciones de digestión comprenden enzimas de digestión en un medio de cultivo apropiado, tal como DMEM. Las soluciones de digestión típicas incluyen colagenasa de tipo I (aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 500 U/ml). Las soluciones de digestión para esta etapa del proceso, en general, no comprenden tripsina. La agitación es en general a 37 °C hasta que la digestión del amnios se ha completado esencialmente, como se evidencia, por ejemplo, mediante la disolución completa de la membrana amniótica produciendo una suspensión homogénea (de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 90 minutos). A continuación, se añade PBS/FBS a 5 % caliente a una proporción de aproximadamente 1 ml por gramo de tejido del amnios a aproximadamente 50 ml por gramo de tejido del amnios, y se agita durante aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 5 minutos. Se filtra la suspensión celular para eliminar cualquier tejido sin digerir usando, por ejemplo, un filtro de 40 µm a 100 µm. Se suspenden las células en PBS caliente (aproximadamente 1 ml a aproximadamente 500 ml), y después se centrifugan a 200 x g hasta aproximadamente 400 x g durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, a 300 x g durante aproximadamente 15 minutos a 20 °C. Tras la centrifugación, se retira el sobrenadante y se vuelven a suspender las células en un medio de cultivo adecuado. La suspensión de células se puede filtrar (filtro de 40 µm a 70 µm) para retirar cualquier tejido no digerido restante, produciendo una suspensión de células individuales. El amnios no digerido restante, en esta realización, se puede desechar.

- En dicha realización, las células en suspensión se extraen y se cultivan según lo descrito en otra parte del presente documento para producir células adherentes derivadas del amnios aisladas, y las poblaciones de dichas células. Por ejemplo, en una realización, las células en suspensión se pueden cultivar y las células adherentes derivadas del amnios se pueden separar de las células no adherentes de dicho cultivo para producir una población enriquecida de células adherentes derivadas del amnios. En realizaciones más específicas, al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células de dicha población enriquecida de células adherentes derivadas del amnios son dichas células adherentes derivadas del amnios.

- En cualquiera de los protocolos de digestión del presente documento, la suspensión de células obtenida mediante la digestión se puede filtrar, por ejemplo, a través de un filtro que comprende poros de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 150 µm, por ejemplo, de aproximadamente 75 µm a aproximadamente 125 µm. En una realización más específica, la suspensión de células se puede filtrar a través de dos o más filtros, por ejemplo, un filtro de 125 µm y un filtro de 75 µm.

- En combinación con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las AMDAC se pueden aislar de las células liberadas durante la digestión mediante la selección de las células que expresan una o más características de las AMDAC, según lo descrito en el apartado 5.3 anterior.

- En una realización, las AMDAC se pueden aislar usando, por orden, una primera enzima y una segunda enzima, en la que la primera enzima usada en el método no es colagenasa, y en la que la segunda enzima usada en el método no es tripsina. En otra realización, la etapa de digestión usada para aislar las AMDAC no usa una combinación de dos o más de ninguna entre la colagenasa, la dispasa o la hialuronidasa. En otra realización, las AMDAC no se aíslan a través de cultivo de explante para permitir que las células se puedan detectar por el crecimiento, la replicación o la migración de los explantes.

En otra realización, no se usa desoxirribonucleasa (DNasa) durante el aislamiento de las AMDAC. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la DNasa no se usa tras la etapa de digestión de la colagenasa del aislamiento.



#### 5.6.4 Aislamiento, clasificación y caracterización de células adherentes derivadas del amnios

Los sedimentos celulares pueden volverse a suspender de la composición de extracción de células recién preparada, según lo descrito anteriormente, o un medio adecuado para el mantenimiento de células, por ejemplo, medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM); medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), por ejemplo, medio exento de suero IMDM que contiene 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY); una mezcla de tampón de (por ejemplo, PBS, HBSS) con FBS (por ejemplo, 2 % v/v); o similar.

Las células adherentes derivadas del amnios que se han cultivado, por ejemplo, sobre una superficie, por ejemplo, en el plástico de cultivo tisular, con o sin recubrimiento de matriz extracelular adicional, tal como la fibronectina, se pueden pasar o asilar por adhesión diferencial. Por ejemplo, una suspensión de células obtenida según lo descrito en el apartado 5.6.3 anterior, se puede cultivar, por ejemplo, durante 3-7 días en medio de cultivo sobre plástico de cultivo tisular. Durante el cultivo, una pluralidad de células de la suspensión se adhiere a la superficie de cultivo, y las células no adherentes se retiran durante el intercambio de medio.

El número y tipo de células extraídas del amnios se pueden controlar, por ejemplo, midiendo los cambios de morfología y marcadores de la superficie celular usando técnicas de detección de células convencionales, tales como la inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, la clasificación de células, la inmunocitoquímica (por ejemplo, la tinción con anticuerpos específicos del tejido o específicos del marcador celular), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), mediante el examen de la morfología de las células usando microscopía óptica o confocal y/o midiendo los cambios en la expresión génica usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como la PCR y perfiles de expresión génica. Estas técnicas también se pueden usar para identificar las células que son positivas para uno o más marcadores particulares. Por ejemplo, usando uno o más anticuerpos contra CD34, se puede determinar, usando las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; y si es así, la célula es CD34<sup>+</sup>.

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden aislar por separación de Ficoll, por ejemplo, centrifugación en gradiente de Ficoll. Dicha centrifugación puede seguir cualquier protocolo convencional para la velocidad de centrifugación, etc. En una realización, por ejemplo, las células extraídas tras la digestión del amnios se separan usando un gradiente de Ficoll por centrifugación a 5.000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, y las capas celulares de interés se recogen para su posterior procesamiento.

Las células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo, las células que se han aislado por separación de Ficoll, adhesión diferencial o una combinación de ambas se pueden clasificar usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluyendo células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (véase, por ejemplo, Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151:150-165). La excitación láser de fracciones fluorescentes de partículas individuales produce una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos o ligandos específicos del marcador de la superficie celular se marcan con marcadores fluorescentes distintos. Las células se procesan a través del clasificador de células, permitiendo la separación de las células en función de su capacidad para unirse a los anticuerpos usados. Las partículas clasificadas mediante FACS pueden depositarse directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En un esquema de clasificación, se pueden clasificar células de la placenta, por ejemplo, células adherentes derivadas del amnios, basándose en la expresión de los marcadores CD49f, VEGFR2/KDR y/o Flt-1/VEGFR1. Preferentemente, las células se identifican como OCT-4<sup>-</sup>, por ejemplo, mediante la determinación de la expresión de OCT-4 por RT-PCR en una muestra de las células, en la que las células son OCT-4<sup>-</sup> si las células de la muestra no muestran producción detectable de ARNm para OCT-4<sup>-</sup> tras 30 ciclos. Por ejemplo, las células del amnios que son VEGFR2/KDR<sup>+</sup> y VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> se pueden clasificar a partir de células que son uno o más de VEGFR2/KDR<sup>-</sup> y VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y/o VE-cadherina<sup>-</sup>. En una realización específica, las células que se adhieren al plástico de cultivo tisular, derivadas del amnios, que son uno o más de CD49<sup>+</sup>, VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y/o VE-cadherina<sup>-</sup>, o las células que son VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y VE-cadherina<sup>-</sup>, se clasifican aparte de las células que no expresan uno o más de dichos marcadores, y se seleccionan. En otra realización específica, las células CD49f<sup>+</sup>, VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> que son, además, uno o más, o todos, de CD31<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup> y/o Tie-2<sup>+</sup> se clasifican aparte de las células que no muestran una o más, o ninguna, de dichas características. En otra realización específica, las células VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup> que son, además, uno o más, o todos de CD9<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD98<sup>+</sup>, Tie-2<sup>+</sup>, TEM-7<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD143<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup> y/o CXCR4<sup>-</sup>, se clasifican aparte de las células que no muestran una o más, o ninguna, de dichas características.

La selección de células adherentes derivadas del amnios se puede realizar en una suspensión de células resultante de la digestión, o en células aisladas extraídas de la materia digerida, por ejemplo, por centrifugación o separación mediante citometría de flujo. La selección mediante marcadores expresados se puede realizar sola o, por ejemplo, en relación con procedimientos de selección de células basándose en sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, se puede realizar una selección por adhesión antes o después de la clasificación basándose en la expresión de los marcadores.

Con respecto a la detección y clasificación de células del amnios mediadas por anticuerpos, se puede usar cualquier anticuerpo específico de un determinado marcador en combinación con cualquier fluoróforo u otro marcador adecuado para la detección y clasificación de células (por ejemplo, la clasificación de células activadas por fluorescencia). Las combinaciones de anticuerpos/fluoróforo contra marcadores específicos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra CD105 (disponibles de R & D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota); anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (PE) contra CD200 (BD Biosciences Pharmingen); VEGFR2/KDR-Biotina (CD309, Abcam), y similares. Los anticuerpos contra cualquiera de los marcadores desvelados en el presente documento pueden marcarse con cualquier marcador convencional contra anticuerpos que facilitan la detección de los anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, acetilcolinesterasa estreptavidina/biotina, avidina/biotina, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina (PE), luminol, luciferasa, luciferina y aequorina, y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ .

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden marcar con un anticuerpo contra un solo marcador y detectarse y/o clasificarse en base a ese solo marcador, o se pueden marcar simultáneamente con múltiples anticuerpos contra una pluralidad de diferentes marcadores y ordenarse basándose en la pluralidad de marcadores.

En otra realización, las perlas magnéticas se pueden usar para separar células, por ejemplo, para separar las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento de otras células del amnios. Las células se pueden clasificar usando una técnica de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), un método de separación de partículas en función de su capacidad para unirse a perlas magnéticas (0,5 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro). Se puede realizar una variedad de modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de un anticuerpo que reconozca específicamente una determinada molécula de superficie celular o hapteno. Las perlas se mezclan entonces con las células para permitir la unión. Después, se pasan las células a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de superficie celular específico. En una realización, estas células luego se pueden aislar y volverse a mezclar con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de superficie celular adicionales. Las células se vuelven a pasar a través de un campo magnético, aislando las células que se hayan unido a los anticuerpos. Dichas células se pueden diluir luego en placas separadas tales como placas de microtitulación para el aislamiento clonal.

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden evaluar para determinar la viabilidad, el potencial de proliferación y la longevidad usando técnicas convencionales conocidas en la materia tales como el ensayo de exclusión con azul de tripano, ensayo de absorción de diacetato de fluoresceína, ensayo de absorción de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y el ensayo de absorción de timidina o ensayo de proliferación celular con MTT (para evaluar la proliferación). Se puede determinar la longevidad mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como mediante la determinación del número máximo de duplicación de la población en un cultivo prolongado.

Las células adherentes derivadas del amnios también se pueden separar de otras células de la placenta o del amnios usando otras técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, el crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva), la destrucción selectiva de las células no deseadas (selección negativa); la separación basada en la capacidad de aglutinación celular diferencial de la población mixta como, por ejemplo, con la aglutinina de soja; procedimientos de congelación y de descongelación; filtración; centrifugación convencional y zonal; decantación centrífuga (centrifugación a contracorriente); unidad de separación por gravedad; distribución a contracorriente; electroforesis; y similares.

## 5.7 CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

### 5.7.1 Medios de cultivo

Las células adherentes derivadas del amnios aisladas, o las poblaciones de dichas células, se pueden usar para iniciar, o sembrar, cultivos de células. En general, las células se transfieren a recipientes de cultivo tisular estériles, bien no cubiertos o cubiertos con una matriz extracelular o biomoléculas tales como laminina, colágeno (por ejemplo, natural o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina y proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

Las AMDAC se pueden establecer, por ejemplo, en un medio adecuado para el cultivo de células madre. Los medios para el establecimiento pueden incluir, por ejemplo, medio EGM-2 (Lonza), DMEM + FBS a 10 % o medio que comprende DMEM-LG a 60 % (Gibco), MCDB-201 a 40 % (Sigma), suero de ternera fetal a 2 % (FCS) (Hyclone Laboratories), 1 x insulina-transferrina-selenio (ITS), 1 x ácido lenoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA), dexametasona  $10^{-9}$  M (Sigma), 2-fosfato de ácido ascórbico  $10^{-4}$  M (Sigma), factor de crecimiento epidérmico (EGF) a 10 ng/ml (R & D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) a 10 ng/ml (R & D Systems) y 100 U de penicilina/1.000 U de estreptomina (denominado en el presente documento como "medio convencional").

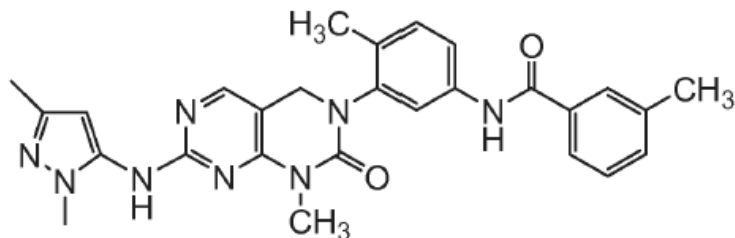
Las células adherentes derivadas del amnios se pueden cultivar en cualquier medio, y en cualquier condición, reconocidos en la técnica como aceptables para el cultivo de células, por ejemplo, células madre adherentes de placenta. Preferentemente, el medio de cultivo comprende suero. En diversas realizaciones, los medios de cultivo o

subcultivo de AMDAC incluyen STEMPRO® (Invitrogen), MSCM-sf (ScienCell, Carlsbad, CA), medio MESENCULT®-ACF (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), medio convencional, medio convencional que carece de EGF, medio convencional que carece de PDGF, DMEM + FBS a 10 %, EGM-2 (Lonza), EGM-2MV (Lonza), medio ES a 2 %, 10 % y 20 %, medio de ES-SSR o  $\alpha$ -MEM-FBS a 20 %. El medio aceptable para el cultivo de células adherentes derivadas del amnios incluye, por ejemplo, DMEM, IMDM, DMEM (nivel alto o bajo de glucosa), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM Lonza), medio ADVANCESTEM™ (Hyclone), DMEM KNOCKOUT™ (Invitrogen), medio L-15 de Leibovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE, o similares. En diversas realizaciones, por ejemplo, DMEM-LG (medio esencial modificado por Dulbecco, nivel bajo de glucosa)/MCDB 201 (medio basal de fibroblastos de polluelo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA + BSA (ácido linoleico-albúmina de suero bovino), dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1 y penicilina/estreptomocina; DMEM-HG (glucosa alta) que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente 10 %, suero bovino fetal (FBS; por ejemplo, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan Utah); DMEM-HG que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente 15 %, FBS; IMDM (medio de Dulbecco modificado por Iscove) que comprende aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente 10 %, FBS, aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente 10 %, suero de caballo e hidrocortisona; M199 que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 % o, por ejemplo, aproximadamente 10 %, FBS, EGF y heparina;  $\alpha$ -MEM (medio esencial mínimo) que comprende aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente 10 %, FBS, GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende FBS a 10 %, GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM-LG que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente 15 %, suero bovino fetal (v/v) (por ejemplo, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan Utah), antibióticos/antimicóticos (por ejemplo, penicilina a aproximadamente 100 Unidades/mililitro, estreptomocina a 100 microgramos/mililitro y/o anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)) y  $\beta$ -mercaptoetanol a 0,001 % (v/v) (Sigma, St. Louis Mo.); medio basal KNOCKOUT™-DMEM complementado con FBS de 2 a 20 %, aminoácido no esencial (Invitrogen), beta-mercaptoetanol, medio basal KNOCKOUT™ complementado con reemplazo de suero KNOCKOUT™,  $\alpha$ -MEM que comprende FBS de 2 a 20 %, medio basal EBM2™ complementado con EGF, VEGF, bFGF, R3-IGF-1, hidrocortisona, heparina, ácido ascórbico, FBS, gentamicina), o similares.

El medio de cultivo se puede complementar con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero (por ejemplo, FCS o FBS, por ejemplo, aproximadamente 2-20 % (v/v); suero equino (de caballo) ((ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferentemente a aproximadamente 0,001 % (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más antibióticos/agentes antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomocina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, bien solos o en combinación.

Las células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) se pueden cultivar en condiciones de cultivo tisular convencionales, por ejemplo, en placas o placas de múltiples pocillos de cultivo tisular. Las células también se pueden cultivar usando el método de la gota colgante. En dicho método, se suspenden las células a aproximadamente  $1 \times 10^4$  células por ml en aproximadamente 5 ml de medio, y se colocan una o más gotas del medio en el interior de la tapa de un recipiente de cultivo tisular, por ejemplo, una placa Petri de 100 ml. Las gotas pueden ser, por ejemplo, gotas individuales o múltiples gotas de, por ejemplo, una pipeta multicanal. La tapa se invierte cuidadosamente y se coloca encima de la parte inferior de la placa que contiene un volumen de líquido, por ejemplo, PBS estéril suficiente para mantener el contenido de humedad en la atmósfera de la placa, y las células se cultivan. Las AMDAC también se pueden cultivar en sistemas de cultivo convencionales o de alto volumen o de alto rendimiento, tales como matraces en forma de T, Corning HYPERFLASK®, Cell Factories (Nunc), 1, 2, 4, 10 o 40 bandejas de células apiladas, y similares.

En una realización, las células adherentes derivadas del amnios se cultivan en presencia de un compuesto que actúa para mantener un fenotipo no diferenciado en las células. En una realización específica, el compuesto es una 3,4-dihidropiridimol[4,5-d]pirimidina sustituida. En una realización más específica, el compuesto es un compuesto que tiene la siguiente estructura química:



El compuesto se puede poner en contacto con células adherentes derivadas del amnios, o una población de dichas células, a una concentración de, por ejemplo, entre aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ .

### 5.7.2 Expansión y proliferación de células adherentes derivadas del amnios

5 Una vez que una célula adherente derivada del amnios aislada, o una población aislada de dichas células (por ejemplo, células adherentes derivadas del amnios o población de dichas células separadas de al menos 50 % de las células del amnios con las que la célula o la población de células está normalmente asociada *in vivo*), las células se pueden hacer proliferar y expandirse *in vitro*. Por ejemplo, una población de células adherentes o células adherentes derivadas del amnios puede cultivarse en recipientes de cultivo tisular, por ejemplo, palcas, matraces, placas de múltiples pocillos o similares, durante un tiempo suficiente para que las células proliferen hasta 40-70 % de confluencia, es decir, hasta que las células y su progenie ocupen 40-70 % de la superficie de cultivo del recipiente de cultivo tisular.

15 Las células adherentes derivadas del amnios se pueden sembrar en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. Por ejemplo, las células se pueden sembrar de baja densidad (por ejemplo, de aproximadamente 400 a aproximadamente 6.000 células/cm<sup>2</sup>) a alta densidad (por ejemplo, aproximadamente 20.000 o más células/cm<sup>2</sup>). En una realización preferida, las células se cultivan de aproximadamente 0 % a aproximadamente 5 % en volumen de CO<sub>2</sub> en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 25 % de O<sub>2</sub> en aire, preferentemente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % de O<sub>2</sub> en aire. Las células se cultivan preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente a aproximadamente 37 °C.

20 Las células se cultivan preferentemente en una incubadora. Durante el cultivo, el medio de cultivo puede estar estático o se puede agitar, por ejemplo, durante el cultivo usando un biorreactor. Las células adherentes derivadas del amnios se cultivan preferentemente bajo estrés oxidativo bajo (por ejemplo, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína, o similares).

25 Aunque las células adherentes derivadas del amnios se pueden cultivar hasta la confluencia, las células preferentemente no se cultivan hasta la confluencia. Por ejemplo, una vez que se obtiene una confluencia de 40 % - 70 %, las células se pueden pasar. Por ejemplo, las células se pueden tratar enzimáticamente, por ejemplo, tratar con tripsina, usando técnicas bien conocidas en la materia, para separarlas de la superficie de cultivo tisular. Tras retirar las células mediante pipeteo y contarlas, aproximadamente 20.000-100.000 células, preferentemente aproximadamente 50.000 células, o de aproximadamente 400 a aproximadamente 6.000 células/cm<sup>2</sup>, se pueden pasar a un nuevo recipiente de cultivo que contenga medio de cultivo recién preparado. Por lo general, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del que se retiraron las células. Las células adherentes derivadas del amnios se pueden pasar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces, o más. Las AMDAC se pueden duplicar en cultivo al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o al menos 50 veces, o más.

## 5.8 COMPOSICIONES QUE COMPRENEN CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

### 5.8.1 Composiciones farmacéuticas que comprenden células adherentes derivadas del amnios

40 En ciertas realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios están contenidas dentro de, o son componentes de, una composición farmacéutica. Las células se pueden preparar en una forma que sea fácilmente administrable a un individuo, por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios que están contenidas dentro de un recipiente que es adecuado para uso médico. Dicho recipiente puede ser, por ejemplo, una jeringa, una bolsa de plástico estéril, un matraz, un vial, un tarro u otro recipiente del que la población de células adherentes derivadas del amnios se puede dispensar fácilmente. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otro plástico, 45 bolsa médicamente aceptable adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El recipiente, en ciertas realizaciones, es aquel que permite la crioconservación de las células. Las células de las composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que se proporcionan en el presente documento, pueden comprender células adherentes derivadas del amnios que derivan de un solo donante o de múltiples donantes. Las

células pueden ser completamente HLA compatibles con un receptor, o parcial o completamente HLA incompatibles.

Por lo tanto, en una realización, las células adherentes derivadas del amnios de las composiciones proporcionadas en el presente documento se administran a un individuo que las necesita en forma de una composición que comprende células adherentes derivadas del amnios en un recipiente. En otra realización específica, el recipiente es una bolsa, un matraz, un vial o un tarro. En una realización más específica, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. En una realización más específica, dicha bolsa es adecuada para, permite o facilita, la administración intravenosa de dichas células adherentes, por ejemplo, por infusión intravenosa, inyección en bolo o similares. La bolsa puede comprender múltiples lúmenes o compartimentos que estén interconectados para permitir la mezcla de las células y una o más de otras soluciones, por ejemplo, un fármaco, antes de, o durante, la administración. En otra realización específica, antes de la crioconservación, la solución que comprende las células adherentes derivadas del amnios comprende uno o más compuestos que facilitan la crioconservación de las células. En otra realización específica, dichas células adherentes derivadas del amnios están contenidas dentro de una solución acuosa fisiológicamente aceptable. En una realización más específica, dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable es una solución de NaCl a 0,9 %. En otra realización específica, dichas células adherentes derivadas del amnios comprenden células que son HLA compatibles con un receptor de dichas células. En otra realización específica, dichas células adherentes derivadas del amnios comprenden células que son al menos parcialmente HLA incompatibles con un receptor de dichas células. En otra realización específica, dichas células adherentes derivadas del amnios se derivan de una pluralidad de donantes. En diversas realizaciones específicas, dicho recipiente comprende aproximadamente, al menos, o como máximo  $1 \times 10^6$  de dichas células,  $5 \times 10^6$  de dichas células,  $1 \times 10^7$  de dichas células madre,  $5 \times 10^7$  de dichas células,  $1 \times 10^8$  de dichas células,  $5 \times 10^8$  de dichas células,  $1 \times 10^9$  de dichas células,  $5 \times 10^9$  de dichas células,  $1 \times 10^{10}$  o  $1 \times 10^{11}$  de dichas células. En otras realizaciones específicas de cualquiera de las poblaciones crioconservadas anteriores, dichas células se han pasado aproximadamente, al menos, o no más de 5 veces, no más de 10 veces, no más de 15 veces o no más de 20 veces. En otra realización específica de cualquiera de las células crioconservadas anteriores, dichas células se han ampliado dentro de dicho recipiente. En realizaciones específicas, una sola dosis unitaria de células adherentes derivadas del amnios puede comprender, en diversas realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más células adherentes derivadas del amnios.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden poblaciones de células adherentes derivadas del amnios que comprenden 50 % de células viables o más (es decir, al menos 50 % de las células de la población son funcionales o están vivas). Preferentemente, al menos 60 % de las células de la población son viables. Más preferentemente, al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células de la población de la composición farmacéutica son viables.

### **5.8.2 Matrices que comprenden células adherentes derivadas del amnios**

En el presente documento, además se proporcionan composiciones que comprenden matrices, hidrogeles, armazones, y similares. Dichas composiciones se pueden usar en lugar de, o además de, dichas células en suspensión líquida.

La matriz puede ser, por ejemplo, un tejido descelularizado permanente o degradable, por ejemplo, una membrana amniótica descelularizada o una matriz sintética. La matriz puede ser una estructura tridimensional. En una realización más específica, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina o vitronectina. En otra realización más específica, la matriz es una membrana amniótica o un biomaterial derivado de membrana amniótica. En otra realización más específica, dicha matriz comprende una proteína de membrana extracelular. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto sintético. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otra realización más específica, dicho compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, una citocina, un anticuerpo o una molécula orgánica de menos de 5.000 Da.

Las células adherentes derivadas del amnios que se describen en el presente documento se pueden sembrar en una matriz natural, por ejemplo, un biomaterial de placenta, tal como un material de membrana amniótica. Dicho material de membrana amniótica puede ser, por ejemplo, de membrana amniótica diseccionada directamente de una placenta de mamífero; membrana amniótica fija o tratada térmicamente, membrana amniótica esencialmente seca (es decir,  $H_2O$  a  $< 20$  %, membrana coriónica, membrana coriónica esencialmente seca, membrana amniótica y coriónica esencialmente seca, y similares. Los biomateriales de placenta preferidos en los que se pueden sembrar las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento se describen en la publicación de solicitud de EE.UU. nº 2004/0048796, de Hariri, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En otra realización específica, la matriz es una composición que comprende una matriz extracelular. En una realización más específica, dicha composición es MATRIGEL™ (BD Biosciences).

Las células adherentes derivadas del amnios aisladas que se describen en el presente documento se pueden suspender en una solución de hidrogel adecuada para, por ejemplo, la inyección. El hidrogel es, por ejemplo, un

polímero orgánico (natural o sintético) que está reticulado a través de enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura de red cristalina abierta tridimensional que atrape moléculas de agua para formar un gel. Los hidrogeles adecuados para dichas composiciones incluyen péptidos que se autoensamblan, tales como RAD16. En una realización, se puede dejar que se endurezca una solución de hidrogel que comprenda las células, por ejemplo, en un molde, para formar una matriz que tenga células dispersadas en la misma para su implantación. Las células adherentes derivadas del amnios de dicha matriz se pueden cultivar para que las células se expandan mitóticamente, por ejemplo, antes de la implantación. Los materiales formadores de hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales de los mismos, péptidos, polifosfazinas y poliacrilatos, que se reticulan iónicamente, o polímeros de bloques tales como copolímeros de bloques de óxido de polipropileno-polietilenglicol que se reticulan por la temperatura o el pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o la matriz son biodegradables.

En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden células, proporcionadas en el presente documento, comprenden un gel polimerizable *in situ* (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2002/0022676; Anseth *et al.*, *J. Control Release*, 78(1-3): 199-209 (2002); Wang *et al*, *Biomaterials*, 24(22):3969-80 (2003). En algunas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas tales como agua, soluciones salinas tamponadas o soluciones acuosas de alcohol que tienen grupos laterales cargados, o una de sus sales iónicas monovalentes. Los ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que pueden hacerse reaccionar con cationes son poli(fosfacenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. También se pueden usar copolímeros que tengan grupos laterales ácidos formados mediante la reacción de monómeros o polímeros de ácido acrílico o metacrílico y viniléter. Los ejemplos de grupos ácidos son grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos de alcohol halogenado (preferentemente fluorado), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.

En una realización específica, la matriz es un fieltro que puede estar compuesto de un hilo multifilamento de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro usando técnicas de procesamiento textil convencionales que consisten de engaste, corte, cardado y punción. En otra realización preferida, las células de la invención se siembran en armazones de espuma que pueden ser estructuras de material compuesto. Además, la estructura tridimensional se puede moldear en una forma útil, tal como una estructura específica en el cuerpo que se vaya a reparar, sustituir o aumentar. Otros ejemplos de armazones que se pueden usar incluyen mallas no tejidas, espumas porosas o péptidos de autoensamblaje. Las mallas no tejidas se pueden formar usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (por ejemplo, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). También se pueden usar como armazones las espumas compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli( $\epsilon$ -caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formado mediante procesos tales como criodeseccación o liofilización (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.355.699).

Las células adherentes derivadas del amnios que se describen en el presente documento se pueden sembrar en una estructura o una estructura tridimensional, e implantarse *in vivo*. Dicha estructura se puede implantar en combinación con uno cualquiera o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que, por ejemplo, estimulen la formación de tejido, por ejemplo, la formación de hueso o la formación de vasculatura.

Las células adherentes derivadas del amnios que se proporcionan en el presente documento, en otra realización, se pueden sembrar en armazones de espuma que pueden ser estructuras de material compuesto. Dichas estructuras de espuma se pueden moldear en una forma útil, tal como la de una parte de una estructura específica del cuerpo que se vaya a reparar, sustituir o aumentar. En algunas realizaciones, la estructura se trata, por ejemplo, con ácido acético 0,1 M seguido de la incubación en polilisina, PBS y/o colágeno, antes de la inoculación de las células para mejorar la unión celular. Las superficies externas de una matriz se pueden modificar para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como mediante el recubrimiento con plasma de la matriz o la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, etc.), una matriz celular y/u otros materiales tales como, pero sin limitación, gelatina, alginatos, gomas agar, agarosa y gomas vegetales, y similares.

En algunas realizaciones, la matriz comprende, o se trata con, materiales que la vuelven trombogénica. Estos tratamientos y materiales también pueden potenciar y mantener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de la matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero sin limitación, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno de tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE y siliconas de poliuretano urea segmentadas, tales como PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). La matriz también puede comprender agentes anti-trombóticos tales como la heparina; los armazones también se pueden tratar para alterar la carga de la superficie (por ejemplo, recubrimiento con plasma) antes de la siembra con las células adherentes proporcionadas en el presente documento.

El armazón se puede tratar antes de la inoculación de las células adherentes derivadas del amnios que se proporcionan en el presente documento para mejorar la unión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación con las células de la invención, se podrían tratar matrices de nylon con ácido acético 0,1 molar e incubarse en polilisina,

PBS y/o colágeno para recubrir el nylon. El poliestireno se puede tratar de forma similar usando ácido sulfúrico.

Además, las superficies externas de las estructuras tridimensionales se pueden modificar para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como mediante recubrimiento con plasma de la estructura o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), una matriz celular y/o otros materiales tales como, pero sin limitación, gelatina, alginatos, gomas agar, agarosa o gomas vegetales.

En algunas realizaciones, la matriz comprende o se trata con materiales que vuelven la matriz no trombogénica, por ejemplo, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal, tales como laminina y colágeno de tipo IV, y materiales sintéticos tales como ePTFE o siliconas poliuretanoarea segmentadas tales como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). Dichos materiales se pueden tratar además para volver el armazón no trombogénico, por ejemplo, con heparina, y tratamientos que alteran la carga de la superficie del material, tal como el recubrimiento con plasma.

Las composiciones de células terapéuticas que comprenden células adherentes derivadas del amnios también se pueden proporcionar en forma de un complejo de células de la matriz. Las matrices pueden incluir armazones biocompatibles, redes cristalinas, estructuras de autoensamblaje y similares, sean o no bioabsorbibles, líquidas, de gel o sólidas. Dichas matrices son conocidas en las técnicas de tratamiento terapéutico de células, reparación quirúrgica, ingeniería de tejidos y curación de heridas. En ciertas realizaciones, las células se adhieren a la matriz. En otras realizaciones, las células están atrapadas o contenidas dentro de espacios de la matriz. Los más preferidos son los complejos de células de la matriz en los que las células crecen en estrecha asociación con la matriz y, cuando se usan terapéuticamente, estimulan y mantienen la increscencia de las células de un receptor. Las composiciones de células de la matriz se pueden introducir en el cuerpo de un individuo de cualquier modo conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, la implantación, inyección, fijación quirúrgica, trasplante con otro tejido, inyección, y similares. En algunas realizaciones, las matrices se forman *in vivo* o *in situ*. Por ejemplo, se pueden usar geles polimerizables *in situ* de acuerdo con la invención. Los ejemplos de dichos geles son conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, las células proporcionadas el presente documento se siembran en dichas matrices tridimensionales, tales como armazones y se implantan *in vivo*, donde las células sembradas pueden proliferar sobre o en la estructura, o ayudar a establecer el tejido de reemplazo *in vivo* con o sin la cooperación de otras células. El crecimiento de las células adherentes derivadas del amnios o de cultivos conjuntos de las mismas en la estructura tridimensional, preferentemente, da lugar a la formación de un tejido tridimensional, o fundación del mismo, que se puede utilizar *in vivo*, por ejemplo, para reparar el tejido dañado o enfermo. Por ejemplo, las estructuras tridimensionales se pueden usar para formar estructuras tubulares, por ejemplo, para su uso en la reparación de los vasos sanguíneos; o aspectos del sistema circulatorio o estructuras coronarias. De acuerdo con un aspecto de la invención, las células adherentes derivadas del amnios, o los cultivos conjuntos de las mismas, se inoculan o se siembran en una estructura tridimensional o una matriz, tal como un armazón, una espuma o hidrogel. La estructura se puede configurar de varias formas tales como generalmente plana, generalmente cilíndrica o tubular, o puede ser una forma completamente libre según se necesite o se desee para la estructura correctora en consideración. En algunas realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios crecen en la estructura tridimensional, mientras que, en otras realizaciones, las células solo sobreviven, o incluso mueren, pero estimulan o potencian la increscencia del tejido nuevo o la vascularización en un receptor.

Las células de la invención se pueden cultivar libremente en cultivo, retirar del cultivo e inocular en una estructura tridimensional. La inoculación de la estructura tridimensional con una concentración de células, por ejemplo, de aproximadamente  $10^6$  a  $5 \times 10^7$  células por mililitro, preferentemente da lugar al establecimiento del soporte tridimensional en períodos relativamente cortos de tiempo. Además, en algunas aplicaciones, se puede preferir usar un mayor o menor número de células en función del resultado deseado.

En una realización específica, la matriz se puede cortar en una tira (por ejemplo, de forma rectangular), de la que la anchura es aproximadamente igual a la circunferencia interior de un órgano tubular en el que se insertará en última instancia. Las células adherentes derivadas del amnios se pueden inocular en el armazón e incubarse por flotación o suspensión en medios líquidos. En la etapa apropiada de confluencia, el armazón se puede enrollar en un tubo uniendo los bordes largos entre sí. Luego se puede cerrar la costura mediante la sutura de los dos bordes entre sí usando fibras de un material adecuado con un diámetro apropiado. Para evitar que las células obstruyan la luz, uno de los extremos abiertos de la estructura tubular se puede fijar con una boquilla. Los medios líquidos se pueden forzar a través de la boquilla de una cámara de origen conectada a la cámara de incubación para crear una corriente a través del interior de la estructura tubular. El otro extremo abierto se puede fijar a una abertura de salida que conduzca a una cámara colectora desde la que los medios se pueden volver a hacer circular a través de la cámara de origen. El tubo se puede extraer de la boquilla y de la abertura de salida cuando la incubación se ha completado. Véase, por ejemplo, solicitud internacional n.º WO 94/25584.

En general, las dos estructuras tridimensionales se pueden combinar en un tubo de acuerdo con la invención usando cualquiera de los siguientes métodos. Se pueden colocar dos o más estructuras planas encima de otra y suturarse. Luego se puede enrollar la lámina de dos capas resultante y, como se ha descrito anteriormente, unirse entre sí y

fijarse. En ciertas realizaciones, se puede inocular un armazón tubular que sirva como capa interior con células adherentes derivadas del amnios e incubarse. Se puede cultivar un segundo armazón como una tira plana con anchura ligeramente superior a la circunferencia externa de la estructura tubular. Una vez obtenido el crecimiento apropiado, se envuelve la estructura plana en torno a la parte exterior del armazón tubular tras lo que se cierra la costura de los dos bordes de la estructura plana y se fija la estructura plana al tubo interior. En otra realización, se pueden cultivar por separado dos o más mallas tubulares de diámetros ligeramente diferentes. La estructura con el diámetro más pequeño se puede insertar dentro de la más grande y fijarse. Para cada uno de estos métodos, se pueden agregar más capas volviendo a aplicar el método en el tubo de doble capa. Los armazones se pueden combinar en cualquier etapa de crecimiento de las células adherentes derivadas del amnios y, si se desea, se puede proseguir con la incubación de los armazones combinados.

En combinación con lo anterior, las células y las composiciones terapéuticas proporcionadas en presente documento se pueden usar en combinación con los dispositivos implantables. Por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios se pueden administrar junto con, por ejemplo, endoprótesis vasculares, válvulas artificiales, dispositivos de asistencia ventricular, bobinas desmontables de Guglielmi y similares. Como los dispositivos pueden constituir la terapia dominante proporcionada a un individuo en necesidad de dicha terapia, las células y similares se pueden usar como terapia de apoyo o secundaria para ayudar en, estimular o potenciar la curación adecuada en la zona del dispositivo implantado. Las células y las composiciones terapéuticas de la invención también pueden usarse para pretratar ciertos dispositivos implantables, para reducir al mínimo los problemas cuando se usan *in vivo*. Dichos dispositivos pretratados, incluyendo los dispositivos recubiertos, pueden ser mejor tolerados por los pacientes que los reciben, con menor riesgo de infección local o sistémica o, por ejemplo, de restenosis u oclusión posterior de los vasos sanguíneos.

### **5.8.3 Medios acondicionados por células adherentes derivadas del amnios**

Además, en el presente documento, se proporciona un medio que ha sido acondicionado con células adherentes derivadas del amnios, es decir, medio que comprende una o más biomoléculas secretadas o excretadas por las células adherentes. En diversas realizaciones, el medio acondicionado comprende medio en el que las células han crecido durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días, o durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 duplicaciones de la población, o más. En otras realizaciones, el medio acondicionado comprende medio en el que las células adherentes derivadas del amnios han crecido hasta al menos una confluencia de 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o hasta una confluencia de 100 %. Dicho medio acondicionado se puede usar para mantener el cultivo de una población de células, por ejemplo, células madre, por ejemplo, células madre de la placenta, células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre adultas, o similares. En otra realización, el medio acondicionado comprende medio en el que se han cultivado juntas células adherentes derivadas del amnios y células que no son células adherentes derivadas del amnios.

El medio acondicionado puede comprender las células adherentes proporcionadas en el presente documento. Por lo tanto, en el presente documento, se proporciona un cultivo celular que comprende células adherentes derivadas del amnios. En una realización específica, el medio acondicionado comprende una pluralidad, por ejemplo, una población, de células adherentes derivadas del amnios.

El medio acondicionado se puede extraer del cultivo celular y filtrarse y/o esterilizarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, el medio acondicionado se puede esterilizar para neutralizar la actividad de posibles agentes contaminantes de la materia filtrada a través de un filtro de poro pequeño (por ejemplo, un filtro de 0,22  $\mu\text{M}$ ) para eliminar contaminantes. En algunas realizaciones, el medio acondicionado se puede usar inmediatamente después de la extracción y esterilización/filtración en un método de tratamiento proporcionado en el presente documento. En otras realizaciones, el medio acondicionado se puede congelar y almacenar para su uso posterior en un método de tratamiento proporcionado en el presente documento.

## **5.9 CONSERVACIÓN DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS**

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden conservar, es decir, colocarse en condiciones que permitan el almacenamiento a largo plazo, o condiciones que inhiban la muerte celular, por ejemplo, mediante apoptosis o necrosis, por ejemplo, durante la extracción o antes de la producción de las composiciones descritas en el presente documento, por ejemplo, usando los métodos descritos en el presente documento.

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden conservar usando, por ejemplo, una composición que comprenda un inhibidor de la apoptosis, inhibidor de la necrosis y/o perfluorocarbono portador de oxígeno, según lo descrito en la publicación de solicitud de EE.UU. n.º 2007/0190042, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En una realización, un método de conservación de dichas células, o una población de dichas células, comprende poner en contacto dichas células o población de células con una composición de extracción de células que comprenda un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono portador de oxígeno, en el que dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir o prevenir la apoptosis de la población de células, en comparación con una población de células no puesta en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de caspasa. En otra realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de JNK. En



una realización más específica, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación ni la proliferación de células adherentes derivadas del amnios. En otra realización, dicha composición de extracción de células comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en fases separadas. En otra realización, dicha composición de extracción de células comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en una emulsión. En otra realización, la composición de extracción de células comprende además un emulsionante, por ejemplo, lecitina. En otra realización, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están a entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 25 °C en el momento de contacto de las células. En otra realización más específica, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están a entre aproximadamente 2 °C y 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 5 °C, en el momento del contacto de las células. En otra realización más específica, dicho contacto se realiza durante el transporte de dicha población de células. En otra realización más específica, dicho contacto se realiza durante la congelación y la descongelación de dicha población de células.

Las poblaciones de células adherentes derivadas del amnios se pueden conservar, por ejemplo, mediante un método que comprende poner en contacto una población de dichas células con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto de conservación de órganos, en el que dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir o prevenir la apoptosis de la población de células, en comparación con una población de células no puesta en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, el compuesto de conservación de órganos es solución de UW (descrita en la patente de EE.UU. n.º 4.798.824; también conocida como ViaSpan; véase también Southard *et al.*, "Transplantation", 49(2):251-257 (1990)) o una solución descrita en Stern *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.552.267. En otra realización, dicho compuesto de conservación de órganos es almidón de hidroxietilo, ácido lactobiónico, rafinosa o una combinación de los mismos. En otra realización, la composición de extracción de células comprende además un perfluorocarbono de transporte de oxígeno, ya sea en dos fases o como una emulsión.

En otra realización del método, las células adherentes derivadas del amnios se ponen en contacto con una composición de extracción de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y perfluorocarbono portador de oxígeno, compuesto de conservación de órganos, o una combinación de los mismos, por ejemplo, durante un proceso de alteración del tejido, por ejemplo, la digestión enzimática del tejido del amnios. En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios se ponen en contacto con dicho compuesto de extracción de células tras la recolección mediante la alteración del tejido, por ejemplo, digestión enzimática de tejido del amnios.

Por lo general, durante la extracción de las células adherentes derivadas del amnios, el enriquecimiento y el aislamiento, es preferible reducir al mínimo o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y la tensión mecánica. En otra realización del método, por lo tanto, las células adherentes derivadas del amnios, o la población de células que comprenden las células adherentes derivadas del amnios, se expone a una condición de hipoxia durante la extracción, el enriquecimiento o el aislamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, en el que una condición de hipoxia es una concentración de oxígeno que sea, por ejemplo, inferior a una concentración normal de oxígeno atmosférico; inferior a la concentración normal de oxígeno en sangre; o similar. En una realización más específica, dichas células o la población de dichas células se expone a dicha condición de hipoxia durante menos de dos horas durante dicho conservación. En otra realización más específica, dichas células o población de dichas células se expone a dicha condición de hipoxia durante menos de una hora o menos de treinta minutos, o no se expone a una condición de hipoxia, durante la extracción, el enriquecimiento o el aislamiento. En otra realización específica, dicha población de células no se expone a esfuerzo de cizalla durante la extracción, el enriquecimiento o el aislamiento.

Las células adherentes derivadas del amnios se pueden crioconservar, en general o mediante los métodos específicos desvelados en el presente documento, por ejemplo, en un medio de crioconservación en pequeños recipientes, por ejemplo, ampollas. El medio de crioconservación adecuado incluye, pero sin limitación, medio de cultivo, incluyendo, por ejemplo, medio de crecimiento o medio de congelación de células, por ejemplo, medio de congelación celular disponible en el mercado, por ejemplo, medio de congelación de células identificado por los números de catálogo Sigma-Aldrich C2695, C2639 (medio de congelación de células-suero libre x 1, que no contiene DMSO) o C6039 (medio de congelación de células-glicerol x 1 que contiene medio esencial mínimo, glicerol, suero de ternera y suero bovino), 2 x medio PROFREEZE™ de Lonza, metilcelulosa, dextrano, albúmina de suero humano, suero bovino fetal, suero de ternera fetal o Plasmalyte. El medio de crioconservación comprende preferentemente DMSO (dimetilsulfóxido) o glicerol, a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, por ejemplo, de aproximadamente 5 % a 10 % (v/v), incluyendo opcionalmente suero bovino fetal o suero humano. El medio de crioconservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa con o sin glicerol. Las células adherentes derivadas del amnios aisladas se enfrían preferentemente a aproximadamente 1 °C/min durante la crioconservación. Una temperatura preferida de crioconservación es de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -180 °C, preferentemente de aproximadamente -125 °C a aproximadamente -140 °C. Las células crioconservadas se pueden transferir a la fase de vapor de nitrógeno líquido antes de la descongelación para el uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -80 °C, se transfieren a una zona de almacenamiento de nitrógeno líquido. La crioconservación también se puede realizar usando un congelador a velocidad controlada. Las células crioconservadas se descongelan preferentemente a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

## 5.10 CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIO MODIFICADAS

### 5.10.1 Células adherentes derivadas del amnios modificadas genéticamente

En otro aspecto, las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento se pueden modificar genéticamente, por ejemplo, para producir un ácido nucleico o un polipéptido de interés, o para producir una célula diferenciada, por ejemplo, una célula osteogénica, miocito, célula pericítica o célula angiogénica, que produzca un ácido nucleico o un polipéptido de interés. La modificación genética se puede realizar, por ejemplo, usando vectores basados en virus, incluyendo, pero sin limitación, vectores de replicación no integradores, por ejemplo, vectores de virus del papiloma, vectores de SV40, vectores adenovirales; vectores virales de integración, por ejemplo, vector retroviral o vectores virales adeno-asociados; o vectores virales de replicación defectuosa. Otros métodos de introducción del ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas, inyección directa de ADN, o similares.

Las células adherentes proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, se pueden transformar o transfectar con ADN controlado por, o en asociación operativa con, uno o más elementos apropiados de control de la expresión, por ejemplo, secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, sitios de entrada ribosomales internos. Preferentemente, dicho ADN tiene incorporado un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, las células adherentes diseñadas por ingeniería genética se pueden cultivar, por ejemplo, en medio enriquecido, y luego cambiarse a un medio selectivo. En una realización, el ADN usado para diseñar una célula adherente derivada del amnios comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés, por ejemplo, una citocina, un factor de crecimiento, un agente de diferenciación o un polipéptido terapéutico.

El ADN usado para diseñar la célula adherente puede comprender cualquier promotor conocido en la técnica para conducir la expresión de una secuencia de nucleótidos en células de mamífero, por ejemplo, células humanas. Por ejemplo, los promotores incluyen, pero sin limitación, el promotor/potenciador de CMV, el promotor de SV40, el promotor del virus del papiloma, el promotor del virus de Epstein-Barr, el promotor del gen de la elastina, y similares. En una realización específica, el promotor se puede regular de modo que la secuencia de nucleótidos se exprese solo cuando se desee. Los promotores pueden ser bien inducibles (por ejemplo, aquellos asociados con la metalotioneína y las proteínas de choque térmico) o constitutivos.

En otra realización específica, el promotor es específico del tejido o muestra especificidad tisular. Los ejemplos de dichos promotores incluyen, pero sin limitación, la región de control del gen de la cadena ligera 2 de la miosina (Shani, 1985, *Nature* 314: 283) (músculo esquelético).

Las células adherentes derivadas del amnios desveladas en el presente documento se pueden diseñar o seleccionar de otro modo a "desactivar" la expresión de uno o más genes en dichas células. La expresión de un gen nativo para una célula se puede disminuir, por ejemplo, con la inhibición de la expresión mediante la inactivación del gen completamente mediante, por ejemplo, recombinación homóloga. En una realización, por ejemplo, un exón que codifica una región importante de la proteína o un exón 5' con respecto a esa región, se interrumpe por un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, evitando la producción de ARNm normal del gen diana y produciendo la inactivación del gen. También se puede inactivar un gen mediante la creación de una delección en parte de un gen o mediante la delección del gen entero. Mediante el uso de una construcción con dos regiones de homología con respecto al gen diana que están muy separadas en el genoma, se pueden eliminar las secuencias que intervienen en las dos regiones (Mombaerts *et al.*, 1991, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 88:3084). También se pueden usar antisentido, morfolidos, DNazymes, ARN de interferencia pequeños, ARN de horquilla corta y moléculas de ribozima que inhiben la expresión del gen diana para reducir el nivel de actividad del gen diana en las células adherentes. Por ejemplo, las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de los complejos principales de genes de histocompatibilidad (HLA) han mostrado ser los más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Las moléculas de triple hélice se pueden utilizar en la reducción del nivel de actividad del gen diana. Véase, por ejemplo, L. G. Davis *et al.* (eds), 1994, "BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY", II ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. que se incorpora en el presente documento por referencia.

En una realización específica, las células adherentes derivadas del amnios desveladas en el presente documento se pueden modificar genéticamente con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés, pudiéndose controlar la expresión del polipéptido de interés mediante un factor exógeno, por ejemplo, polipéptido, una molécula orgánica pequeñas, o similares. El polipéptido de interés puede ser un polipéptido terapéutico. En una realización más específica, el polipéptido de interés es IL-12 o antagonista del receptor de la interleucina-1 (IL-1Ra). En otra realización más específica, el polipéptido de interés es una fusión del antagonista del receptor de la interleucina-1 y la dihidrofolato reductasa (DHFR), y el factor exógeno es un antifolato, por ejemplo, metotrexato. Dicha construcción es útil el diseño de células adherentes derivadas del amnios que expresan IL-1Ra, o una fusión de IL-1Ra y DHFR, al entrar en contacto con el metotrexato. Dicha construcción se puede usar, por ejemplo, en el tratamiento de la artritis reumatoide. En dicha realización, la fusión de IL-1Ra y DHFR se regula positivamente en traslación tras la exposición a un antifolato tal como metotrexato. Por lo tanto, en otra realización específica, el ácido nucleico usado para diseñar genéticamente una célula adherente derivada del amnios puede comprender secuencias de nucleótidos que codifican un primer polipéptido y un segundo

polipéptido, en el que dichos primer y segundo polipéptidos se expresan como una proteína de fusión que se regula positivamente en traslación en presencia de un factor exógeno. El polipéptido se puede expresar de forma transitoria o a largo plazo (por ejemplo, en el transcurso de semanas o meses). Dicha molécula de ácido nucleico puede comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que permite la selección positiva de células diseñadas o permite la visualización de las células diseñadas. En otra realización más específica, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que es, por ejemplo, fluorescente en condiciones de visualización apropiadas, por ejemplo, luciferasa (Luc). En una realización más específica, dicha molécula de ácido nucleico puede comprender IL-1Ra-DHFR-IRES-Luc, donde IL-1Ra es antagonista del receptor de la interleucina-1, IRES es un sitio de entrada ribosomal interno y DHFR es la dihidrofolato reductasa.

#### 5.10.2 Líneas de células adherentes derivadas del amnios inmortalizadas

Las células adherentes derivadas del amnios de mamífero pueden ser inmortalizadas condicionalmente por transfección con cualquier vector adecuado que contenga un gen promotor del crecimiento, es decir, un gen que codifique una proteína que, en condiciones apropiadas, potencie el crecimiento de la célula transfectada, de modo que la producción y/o la actividad de la proteína potenciadora del crecimiento se pueda regular por un factor externo. En una realización preferida, el gen promotor del crecimiento es un oncogén tal como, pero sin limitación, v-myc, N-myc, c-myc, p53, el antígeno T grande de SV40, el antígeno T grande de polioma, adenovirus E1a o proteína E7 del virus del papiloma humano. En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios se pueden inmortalizar mediante recombinación cre-lox, como se ilustra por una línea de células  $\beta$  pancreáticas humanas por Narushima, M., *et al* (*Nature Biotechnology*, 2005, 23 (10):1274-1282).

La regulación externa de la proteína potenciadora del crecimiento se puede realizar colocando el gen promotor del crecimiento bajo el control de un promotor externamente regulable, por ejemplo, un promotor de la actividad que se pueda controlar por, por ejemplo, mediante la modificación de la temperatura de las células transfectadas o la composición del medio en contacto con las células. En una realización, se puede emplear un sistema de expresión génica controlada por la tetraciclina (tet) (véase Gossen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89:5547-5551, 1992; Hoshimaru *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93:1518-1523, 1996). En ausencia de tet, un transactivador controlado por tet (tTA) dentro de este vector activa de manera potente la transcripción de  $p_{hCMV-t}$ , un promotor mínimo del citomegalovirus humano fusionado a secuencias operadoras de la tet. tTA es una proteína de fusión del represor (tetR) del operón de resistencia tet derivado del transposón-10 de *Escherichia coli* y el dominio ácido de VP16 del virus del herpes simple. Las bajas concentraciones no tóxicas de tet (por ejemplo, 0,01-1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) casi inhiben por completo la transactivación por tTA.

En una realización, el vector contiene además un gen que codifica un marcador seleccionable, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia a los fármacos. El gen bacteriano de resistencia a la neomicina ( $\text{neo}^R$ ) es un marcador que se puede emplear en los presentes métodos. Las células portadoras de  $\text{neo}^R$  se pueden seleccionar mediante medios conocidos por los expertos habituales en la materia, tales como la adición de, por ejemplo, 1-200  $\mu\text{g/ml}$  de G418 al medio de crecimiento.

La transfección se puede realizar mediante cualquiera de una variedad de medios conocidos por los expertos habituales en la materia, incluyendo, pero sin limitación, la infección retroviral. En general, un cultivo de células puede transfectarse por incubación con una mezcla de medio acondicionado recogido de la línea celular productora para el vector y suplementos de  $\text{N}_2$  que contienen DMEM/F12. Por ejemplo, se puede infectar un cultivo de células de la placenta preparado como se ha descrito anteriormente tras, por ejemplo, cinco días *in vitro* mediante la incubación durante aproximadamente 20 horas en un volumen de medio acondicionado y dos volúmenes de suplementos de  $\text{N}_2$  que contienen DMEM/F12. Las células transfectadas que portan un marcador seleccionable se pueden seleccionar entonces según lo descrito anteriormente.

Tras la transfección, los cultivos se pasan sobre una superficie que permite la proliferación, por ejemplo, permite que al menos 30 % de las células se duplique en un período de 24 horas. Preferentemente, el sustrato es un sustrato de poliornitina/laminina, que consiste en plástico de cultivo tisular recubierto con poliornitina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y/o laminina (10  $\mu\text{g/ml}$ ), un sustrato de polilisina/laminina o una superficie tratada con fibronectina. Los cultivos se alimentan entonces cada 3-4 días con medio de crecimiento, que puede estar o no complementado con uno o más factores potenciadores de la proliferación. Los factores de potenciación de la proliferación se pueden añadir al medio de crecimiento cuando los cultivos tienen una confluencia inferior a 50 %.

Las líneas de células adherentes derivadas del amnios inmortalizadas condicionalmente se pueden pasar usando técnicas convencionales, tales como por tripsinización, cuando tienen una confluencia de 80-95 %. Hasta aproximadamente el vigésimo pase, es, en algunas realizaciones, beneficioso mantener la selección (mediante, por ejemplo, la adición de G418 para células que contienen un gen de resistencia a la neomicina). Las células también pueden congelarse en nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

Las líneas celulares clonales se pueden aislar de una línea de células adherentes inmortalizadas condicionalmente preparada según lo descrito anteriormente. En general, dichas líneas celulares clonales se pueden aislar usando técnicas convencionales, tales como por dilución límite o usando anillos de clonación, y expandirse. Las líneas celulares clonales, en general, se pueden cargar y pasar como se ha descrito anteriormente.

Las líneas adherentes derivadas del amnios humanas inmortalizadas condicionalmente, que pueden ser clonales, pero no necesariamente, en general, se pueden hacer diferenciarse mediante la supresión de la producción y/o la actividad de la proteína potenciadora del crecimiento en condiciones de cultivo que facilitan la diferenciación. Por ejemplo, si el gen que codifica la proteína potenciadora del crecimiento está bajo el control de un promotor externamente regulable, las condiciones, por ejemplo, la temperatura o la composición del medio, se pueden modificar para suprimir la transcripción del gen potenciador del crecimiento. Para el sistema de expresión génica controlado por la tetraciclina descrito anteriormente, la diferenciación se puede realizar mediante la adición de tetraciclina para suprimir la transcripción del gen potenciador del crecimiento. En general, 1 µg/ml de tetraciclina durante 4-5 días es suficiente para iniciar la diferenciación. Para potenciar aún más la diferenciación, se pueden incluir agentes adicionales al medio de crecimiento.

### 5.11 DOSIS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

La administración de células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) a un individuo que las necesita puede ser por cualquier vía aceptable médicamente relevante para la enfermedad o afección relacionada con el sistema inmunitario que se vaya a tratar. En otra realización específica de los métodos de tratamiento descritos anteriormente, dichas AMDAC se administran por inyección en bolo. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intravenosa, por ejemplo, por infusión intravenosa. En una realización específica, dicha infusión intravenosa es una infusión intravenosa durante aproximadamente 1 a aproximadamente 8 horas. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran localmente, por ejemplo, en una determinada zona del cuerpo del individuo que padece la enfermedad o afección relacionada con el sistema inmunitario. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran intracranalmente. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran intramuscularmente. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran intraperitonealmente. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran intraarterialmente. En otra realización específica del método de tratamiento, dichas AMDAC aisladas se administran intramuscular, intradérmica o subcutáneamente. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intravenosa. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intraventricular. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intraesternal. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intrasinovial. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran intraocularmente. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intravítrea. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intracerebral. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intracerebroventricular. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intratecal. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por infusión intraósea. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intravesical. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía transdérmica. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intracisternal. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía epidural

En otra realización específica de los métodos de tratamiento descritos anteriormente, dichas AMDAC se administran una vez a dicho individuo. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran a dicho individuo en dos o más administraciones separadas. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  AMDAC aisladas, por ejemplo, AMDAC por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^{11}$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo.

En otras realizaciones específicas, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y aproximadamente  $2 \times 10^6$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente  $2 \times 10^6$  y aproximadamente  $3 \times 10^6$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente  $3 \times 10^6$  y aproximadamente  $4 \times 10^6$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente  $4 \times 10^6$  y aproximadamente  $5 \times 10^6$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente  $5 \times 10^6$  y aproximadamente  $6 \times 10^6$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente  $6 \times 10^6$  y aproximadamente  $7 \times 10^6$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente  $7 \times 10^6$  y aproximadamente  $8 \times 10^6$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente  $8 \times 10^6$  y aproximadamente  $9 \times 10^6$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo; o entre aproximadamente  $9 \times 10^6$  y aproximadamente  $1 \times 10^7$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^7$  y aproximadamente  $2 \times 10^7$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo a dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $1,3 \times 10^7$  y aproximadamente  $1,5 \times 10^7$  AMDAC aisladas

por kilogramo de dicho individuo a dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de hasta aproximadamente  $3 \times 10^7$  AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo a dicho individuo. En una realización concreta, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $5 \times 10^6$  y aproximadamente  $2 \times 10^7$  AMDAC aisladas a dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración a aproximadamente  $150 \times 10^6$  AMDAC aisladas en aproximadamente 20 ml de solución a dicho individuo.

En otra realización específica de los métodos de tratamiento descritos anteriormente, las AMDAC aisladas se administran a un individuo como una sola dosis unitaria. En realizaciones específicas, una sola dosis unitaria de AMDAC puede comprender, en diversas realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más AMDAC.

En una realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $5 \times 10^6$  y aproximadamente  $2 \times 10^7$  AMDAC aisladas a dicho individuo, estando dichas células contenidas en una solución que comprende dextrano a 10 %, por ejemplo, dextrano 40, albúmina de suero humano a 5 % y, opcionalmente, un inmunosupresor. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración entre aproximadamente  $5 \times 10^7$  y  $3 \times 10^9$  AMDAC aisladas intravenosamente. En realizaciones más específicas, dicha administración comprende la administración de aproximadamente  $9 \times 10^8$  AMDAC aisladas o aproximadamente  $1,8 \times 10^9$  AMDAC aisladas intravenosamente. En otra realización específica, dicha administración comprende la administración de entre aproximadamente  $5 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  AMDAC aisladas intracranalmente. En una realización más específica, dicha administración comprende la administración de aproximadamente  $9 \times 10^7$  AMDAC aisladas intracranalmente.

La administración de medio acondicionado con AMDAC a un individuo que lo necesita, puede ser por cualquier vía médicamente aceptable relevante para la enfermedad, trastorno o afección asociado con una lesión del SNC que se vaya a tratar, incluyendo, pero sin limitación, inyección en bolo, vía intravenosa (por ejemplo, infusión intravenosa), vía local (por ejemplo, en una determinada zona del cuerpo del individuo que se ve afectada por la enfermedad, trastorno o afección asociado con una lesión del SNC), por vía intracranial, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraventricular, intrasinovial, intraocular, intravítrea, intracerebral, intracerebroventricular, intratecal, por infusión intraósea, intravesical, transdérmica, intracisternal o epidural. En una realización específica, el medio acondicionado con AMDAC se administra por infusión continua. En otra realización específica, el medio acondicionado con AMDAC se administra como una sola dosis.

En algunas realizaciones, la administración de medio acondicionado por AMDAC a un individuo que lo necesita comprende la administración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,02 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,15 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,25 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,3 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,35 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,4 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,45 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 ml de medio acondicionado con AMDAC por 100 gramos de peso corporal.

## 5.12 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

Las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento se pueden diferenciar. En una realización, la célula se ha diferenciado lo suficiente como para que dicha célula presente al menos una característica de una célula endotelial, una célula miogénica o una célula pericítica, por ejemplo, poniendo en contacto la célula con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o como se describe en los apartados 5.11.2, 6.3.3 o 6.3.4, que se presentan más adelante. En realizaciones más específicas, dicha característica de una célula endotelial, célula miogénica o célula pericítica es la expresión de una o más de CD9, CD31, CD54, CD102, NG2 (antígeno neuronal/glial 2) o actina de músculo liso alfa, que se aumenta en comparación con una célula amniótica que es OCT-4<sup>-</sup>, VEGFR2/KDR<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y VE-cadherina<sup>-</sup>. En otras realizaciones más específicas, dicha característica de una célula endotelial, célula miogénica o célula pericítica es la expresión de uno o más de CD9, CD31, CD54, CD102, NG2 (antígeno neuronal/glial 2) o actina de músculo liso alfa, que se aumenta en comparación con una célula amniótica que es OCT-4<sup>-</sup>, VEGFR2/KDR<sup>+</sup> y VEGFR1/Flt-1<sup>+</sup>.

La diferenciación miogénica (cardiogénica) de las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento se puede realizar, por ejemplo, mediante la disposición de las células en condiciones de cultivo de células que induzcan la diferenciación en cardiomiocitos. Un medio cardiomiocítico preferido comprende DMEM/CBS a 20 % complementado con ácido retinoico, 1  $\mu$ M; factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/ml; y factor de crecimiento transformante beta-1, 2 ng/ml; y factor de crecimiento epidérmico, 100 ng/ml. La

sustitución con suero desactivado (Invitrogen, Carlsbad, California) se puede usar en lugar del CBS. Como alternativa, las células adherentes derivadas del amnios se cultivan en DMEM/CBS a 20 % complementado con 1 a 100, por ejemplo, 50 ng/ml de cardiotropina-1 durante 24 horas. En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios se pueden cultivar durante 10-14 días en medio exento de proteínas durante 5-7 días, después se estimulan con extracto de miocardio humano, por ejemplo, producido por homogenización de miocardio humano en tampón de HEPES a 1 % complementado con suero de sangre de cordón umbilical a 1 %.

La diferenciación se puede confirmar mediante la demostración de la expresión del gen de actina cardiaca, por ejemplo, por RT/PCR, o por golpes visibles de la célula. Se considera que una célula adherente se ha diferenciado en una célula cardiaca cuando la célula muestra una o más de estas características.

#### 10 **5.12.1 Diferenciación en células neurogénicas**

Las células angiogénicas derivadas del amnios, cuando se cultivan en condiciones neurogénicas, se diferencian en células que muestran morfología neuronal y marcadores neuronales. Por ejemplo, las AMDAC, por ejemplo, las AMDAC expandidas durante 4 días en medio DMEM/F12 que contiene FBS a 15 % v/v, con factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), por ejemplo, a aproximadamente 20 ng/ml, factor de crecimiento epidérmico (EGF), por ejemplo, a aproximadamente 20 ng/ml, por ejemplo, durante cuatro días, seguido del cultivo durante cuatro días en medio de inducción que comprende DMEM/F12, exento de suero, que contiene hidroxianisol butilado 200 mM, cloruro de potasio 10 nM, 5 mg/ml de insulina, forskolina 10 nM, ácido valproico 4 nM e hidrocortisona 2 nM. En estas condiciones, las AMDAC muestran la expresión de nestina humana, Tuj1 y GFAP, según lo evaluado mediante tinción de anticuerpos.

#### 20 **5.12.2 Ausencia de diferenciación en células osteogénicas**

Las células adherentes derivadas del amnios no muestran diferenciación osteogénica en los ensayos convencionales de osteogénesis. Por ejemplo, en una realización, la falta de diferenciación osteogénica mostrada por las AMDAC se puede demostrar, por ejemplo, por la falta de deposición de calcio, como se muestra por la falta de tinción de von Kossa de AMDAC en condiciones osteogénicas. Por ejemplo, las AMDAC, por ejemplo, AMDAC recién preparadas o criopreservadas, se pueden suspender en medio de crecimiento, por ejemplo, a aproximadamente 5.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos y placas de 6 pocillos en medio de crecimiento, e incubarse durante la noche, luego se pueden cultivar durante 14-35 días, por ejemplo, 28 días en medio osteogénico. En ciertas realizaciones, el medio osteogénico comprende DMEM-nivel bajo de glucosa, suero bovino fetal a 10 % v/v (FBS), beta glicerofosfato 10 mM, dexametasona 100 nM y sal fosfato de ácido ascórbico 100 µM complementada con factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1), por ejemplo, a 1-100 ng/ml, por ejemplo, 20 ng/ml y proteína-2 morfogenética ósea recombinante humana (BMP-2), por ejemplo, a 1 a 100 ng/ml, por ejemplo, 40 ng/ml. Después, se tiñen las células usando la tinción de von Kossa usando protocolos convencionales; el desarrollo de depósitos de plata negra indica la presencia de mineralización. En el caso de las AMDAC, los cultivos deben ser esencialmente, por ejemplo, completamente, exentos de depósitos, por ejemplo, en comparación con las células madre mesenquimales de la médula ósea, lo que indica que las AMDAC no producen depósitos de calcio y, por lo tanto, no se diferencian por una vía osteogénica.

#### 35 **5.12.3 Ausencia de diferenciación en células condrogénicas**

De igual manera, las células adherentes derivadas del amnios no muestran diferenciación condrogénica en los ensayos convencionales de condrogénesis. Por ejemplo, en una realización, la falta de diferenciación condrogénica por parte de las AMDAC se puede demostrar, por ejemplo, por la falta de desarrollo por parte de las AMDAC de sedimentos celulares en un ensayo de la condrogénesis en el que las células condrogénicas forman sedimentos celulares. Por ejemplo, las AMDAC, por ejemplo, recién preparadas o criopreservadas, por ejemplo, a 2,5 x 10<sup>5</sup> células, se pueden colocar en tubos cónicos de 15 ml y centrifugarse a 200 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente para formar un sedimento celular esférico. Las células extraídas se cultivan luego en medio de inducción condrogénica, por ejemplo, medio de condrocitos de Lonza que contiene TGF beta-3 (por ejemplo, a aproximadamente 10 ng/ml), factor de crecimiento/diferenciación humano recombinante 5 (rhGDF-5) (por ejemplo, a aproximadamente 500 ng/ml) o una combinación de TGF beta-3 (10 nanogramos/mililitro) y rhGDF-5 (por ejemplo, a aproximadamente 500 ng/ml) durante tres semanas. Al final de tres semanas, las células se tiñen con azul de Alcian, que tiñe los mucopolisacáridos y glicosaminoglicanos producidos por las células condrogénicas. Por lo general, mientras que las BM-MSC o los condrocitos, cuando se cultivan en estas condiciones, desarrollarán sedimentos celulares teñidos positivamente con el azul Alcian, las AMDAC ni forman sedimentos ni se tiñen con el azul de Alcian.

## 6. Ejemplos

### 6.1 **EJEMPLO 1: AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS ADHERENTES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA**

55 El presente ejemplo demuestra el aislamiento y la expansión de células adherentes derivadas del amnios.

### 6.1.1 Aislamiento

Las células adherentes derivadas del amnios se aislaron de la membrana amniótica de la siguiente manera. Se cortaron el amnios y el corion de la placenta, y se separó manualmente el amnios del corion. Se enjuagó el amnios con PBS estéril para eliminar la sangre residual, los coágulos de sangre y otros materiales. Se usó una gasa estéril para eliminar la sangre adicional, los coágulos de sangre y otros materiales que no se habían eliminado con el enjuague, y se enjuagó el amnios de nuevo con PBS. Se retiró el exceso de PBS de la membrana, y se cortó el amnios con un bisturí en segmentos de 5,08 cm x 5,08 cm (2" x 2"). Para el desprendimiento de las células epiteliales, se preparó un recipiente de procesamiento conectando un recipiente de procesamiento de vidrio con camisa estéril a un baño de agua circulante a 37 °C usando tubos y conectores, y se situó en una placa de agitación. Se calentó tripsina (0,25 %, 300 ml) a 37 °C en el recipiente de procesamiento; se añadieron los segmentos del amnios, y se agitó la suspensión de amnios/tripsina, por ejemplo, a 100 rpm-150 rpm a 37 °C durante 15 minutos. Se montó un sistema de cribado estéril mediante la colocación de un recipiente estéril en un campo estéril próximo al recipiente de procesamiento e insertando un tamiz estéril de 75 µm a 125 µm en el receptáculo (Millipore, Billerica, MA). Tras agitar los segmentos del amnios durante 15 minutos, se transfirió el contenido del recipiente de procesamiento al tamiz, y se transfirieron los segmentos del amnios, por ejemplo, usando pinzas estériles de nuevo en el recipiente de procesamiento; se desechó la solución de tripsina que contenía las células epiteliales. Se volvieron a agitar los segmentos del amnios con 300 ml de solución de tripsina (0,25 %) según lo descrito anteriormente. Se enjuagó el tamiz con aproximadamente 100-150 ml de PBS, y se desechó la solución de PBS. Tras agitar los segmentos del amnios durante 15 minutos, se transfirió el contenido del recipiente de procesamiento al tamiz. A continuación, se volvieron a transferir los segmentos del amnios al recipiente de procesamiento, y se desechó la solución de tripsina que contenía las células epiteliales. Se agitaron los segmentos del amnios de nuevo con 300 ml de solución de tripsina (0,25 %) según lo descrito anteriormente. Se enjuagó el tamiz con aproximadamente 100-150 ml de PBS, y se desechó la solución de PBS. Tras agitar los segmentos del amnios durante 15 minutos, se transfirió el contenido del recipiente de procesamiento al tamiz. A continuación, se transfirieron de nuevo los segmentos del amnios al recipiente de procesamiento, y se desechó la solución de tripsina que contenía las células epiteliales. Se agitaron los segmentos del amnios en PBS/FBS a 5 % (proporción del amnios con respecto a la solución de PBS/FBS a 5 % en volumen de 1:1) a 37 °C durante aproximadamente 2-5 minutos para neutralizar la tripsina. Se montó un sistema de cribado estéril recién preparado. Tras neutralizar la tripsina, se transfirió el contenido del recipiente de procesamiento al nuevo tamiz, y los segmentos del amnios se transfirieron de nuevo al recipiente de procesamiento. Se añadió PBS estéril, a temperatura ambiente, (400 ml) al recipiente de procesamiento, y se agitó el contenido del recipiente de procesamiento durante aproximadamente 2-5 minutos. Se enjuagó el tamiz con aproximadamente 100 a 150 ml de PBS. Tras la agitación, se transfirió el contenido del recipiente de procesamiento al tamiz; se enjuagó el matraz de procesamiento con PBS, y se desechó la solución de PBS. A continuación, se llenó el recipiente de procesamiento con 300 ml de DMEM previamente calentado, y se transfirieron los segmentos del amnios a la solución de DMEM.

Para la liberación de las células adherentes derivadas del amnios, se trató además la membrana amniótica tratada con colagenasa de la siguiente manera. Se preparó una solución madre estéril de colagenasa (500 U/ml) disolviendo la cantidad apropiada de polvo de colagenasa (variable con la actividad del lote de colagenasa recibido del proveedor) en DMEM. Se filtró la solución a través de un filtro de 0,22 µm y se dispuso en envases estériles individuales. Se añadió una solución de CaCl<sub>2</sub> (0,5 ml, 600 mM) a cada dosis de 100 ml, y se congelaron las dosis. Se añadió colagenasa (100 ml) a los segmentos del amnios en el recipiente de procesamiento, y se agitó el recipiente de procesamiento durante 30-50 minutos o hasta que la digestión del amnios se hubo completado según lo observado a simple vista. Una vez completada la digestión del amnios, se añadieron 100 ml de PBS/FBS a 5 % estéril previamente calentado al recipiente de procesamiento, y se agitó el recipiente de procesamiento durante un tiempo adicional de 2-3 minutos. Tras la agitación, se transfirió el contenido del matraz a un tamiz estéril de 60 µm y se recogió el líquido por filtración al vacío. Se enjuagó el recipiente de procesamiento con 400 ml de PBS, y se esterilizó la solución de PBS por filtración. A continuación, se centrifugó la suspensión celular filtrada a 300 x g durante 15 minutos a 20 °C, y se volvieron a suspender los sedimentos celulares en PBS/FBS a 2 % previamente calentados (aproximadamente, un total de 10 ml).

### 50 6.1.2 Establecimiento

Se añadieron células amnióticas angiogénicas recién aisladas a medio de cultivo que contenía DMEM-LG a 60 % (Gibco); MCB2-201 a 40 % (Sigma); FBS a 2 % (Hyclone Labs), 1 x insulina-transferrina-selenio (ITS); 10 ng/ml de ácido linoleico-albúmina de suero bovina (LA-BSA); dexametasona 1 n (Sigma); 2-fosfato de ácido ascórbico 100 µM (Sigma); 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (R & D Systems); y 10 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (R & D Systems), y se sembraron en un matraz en forma de T a una densidad de siembra de 10.000 células por cm<sup>2</sup>. A continuación, se incubaron el/los dispositivo/s de cultivo a 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5 % con > 90 % de humedad. Se controlaron diariamente la unión celular, el crecimiento y la morfología. Las células no adherentes y los residuos se eliminaron por intercambio del medio. El intercambio del medio se realizó dos veces a la semana. Las células adherentes con morfología típica fibroblastoide/de huso aparecieron varios días después de la siembra inicial. Cuando la confluencia llegó a 40 %-70 % (de 4 a 11 días después de la siembra inicial), las células se cosecharon por tripsinización (tripsina a 0,25 %-EDTA) durante 5 minutos a temperatura ambiente (37 °C). Tras neutralizar con PBS-FBS a 5 %, las células se centrifugaron a 200-400 g durante 5-15 minutos a temperatura

ambiente, y luego se volvieron a suspender en medio de crecimiento. En este punto, se consideró el establecimiento correcto de una línea de AMDAC en el paso inicial. Las células adherentes derivadas del amnios del paso inicial, en algunos casos, se crioconservaron o se expandieron (por ejemplo, se desarrollaron en cultivo de modo que el número de células aumentó).

5 **6.1.3 Procedimiento de cultivo**

Las células adherentes derivadas del amnios se cultivaron en el medio de crecimiento descrito anteriormente y se sembraron a una densidad de 2.000 a 4.000 por cm<sup>2</sup> en un cultivo de tejido apropiado - dispositivo/s de cultivo. A continuación, se incubaron el/los dispositivo/s de cultivo a 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5 % con > 90 % de humedad. Durante el cultivo, se adherirían y proliferarían AMDAC. Se controlaron el crecimiento celular, la morfología y la confluencia diariamente. El intercambio de medio se realizó dos veces a la semana para reponer los nutrientes nuevos en caso de que el cultivo se extendiera a 5 días o más. Cuando la confluencia llegó a 40 %-70 % (a los 3-7 días de la siembra), las células se cosecharon por tripsinización (tripsina a 0,05 %-0,25 %-EDTA) durante 5 minutos a temperatura ambiente (37 °C). Tras la neutralización con PBS-FBS a 5 %, las células se centrifugaron a 200-400 g durante 5-15 minutos a temperatura ambiente, y luego se volvieron a suspender en medio de crecimiento.

15 Las AMDAC aisladas y cultivadas de esta manera normalmente producen 33.530 ± 15.090 unidades formadoras de colonias (fibroblastos) (CFU-F) de la 1 x 10<sup>6</sup> células sembradas.

**6.2 EJEMPLO 2: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS**

**6.2.1 Perfiles de expresión de genes y proteínas**

El presente ejemplo describe la caracterización fenotípica de las células adherentes derivadas del amnios, incluyendo el marcador característico de la superficie celular, el ARNm y la expresión proteómica.

*Preparación de la muestra:* se obtuvieron células adherentes derivadas del amnios según lo descrito en Ejemplo 1. Se cultivaron las células en el paso 6 hasta aproximadamente 70 % de confluencia en medio de crecimiento según lo descrito en el Ejemplo 1 anterior, se trataron con tripsina y se lavaron en PBS. Se cultivaron células NTERA-2 (Colección americana de cultivos tipo, número de ATCC CRL-1973) en DMEM que contenía 4,5 g/l de glucosa, glutamina 2 mM y FBS a 10 %. Se realizaron recuentos de las células nucleadas para obtener un mínimo de 2 x 10<sup>6</sup> a 1 x 10<sup>7</sup> células. A continuación, se lisaron las células usando un kit RNeasy de Qiagen (Qiagen, Valencia, CA), utilizando un QIAshredder, obteniéndose los lisados. Luego se realizó el aislamiento del ARN usando un kit Rneasy de Qiagen. Se determinaron la cantidad y la calidad del ARN usando un espectrofotómetro ND1000 de Nanodrop, 25 ng/μl de ARN/reacción. Las reacciones de ADNc se prepararon usando un kit de archivo de ADNc de alta capacidad de Applied Biosystems (Foster City, CA). Se realizaron reacciones de PCR en tiempo real usando mezclas maestras de PCR universal TAQMAN® Universal de Applied Biosystems. Las reacciones se realizaron en el modo convencional en un sistema de PCR en tiempo real 7300 de Applied Biosystems durante 40 ciclos.

*Análisis de las muestras y resultados:* usando la metodología de PCR en tiempo real y sondas de expresión génica TaqMan® específicas y/o la matriz de angiogénesis humana TAQMAN® (Applied Biosystems), se caracterizaron las células para la expresión de marcadores angiogénicos y cardiomiogénicos relacionados con células madre. Los resultados se expresaron bien como la expresión relativa de un gen de interés en comparación con los controles de células pertinentes o la expresión relativa (delta Ct) del gen de interés en comparación con un gen constitutivo de expresión ubicua (por ejemplo, GAPDH, 18S o GUSB).

Las células adherentes derivadas del amnios expresaron diversos genes angiogénicos y cardiomiogénicos relacionados con las células madre, y mostraron una ausencia relativa de la expresión de OCT-4 en comparación con las células NTERA-2. La Tabla 8 resume la expresión de genes angiogénicos, cardiomiogénicos y de células madre seleccionados, y la Figura 1 demuestra la falta de expresión en las AMDAC de los genes relacionados con las células madre POU5F1 (OCT-4), NANOG, SOX2, NES, DNMT3B y TERT.

45 Tabla 8: Perfil de expresión génica de las células adherentes derivadas del amnios según lo determinado mediante RT-PCR

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
ACTA2	X	
ACTC1	X	
ADAMTS1	X	
AMOT	X	
ANG	X	
ANGPT1	X	



<b>Marcador de AMDAC</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
ANGPT2	X	
ANGPT4		X
ANGPTL1	X	
ANGPTL2	X	
ANGPTL3		X
ANGPTL4	X	
BAI1	X	
BGLAP		X
c-myc	X	
CD31		X
CD34		X
CD44	X	
CD140a	X	
CD140b	X	
CD200	X	
CD202b	X	
CD304	X	
CD309 (VEGFR2/KDR)	X	
CDH5		X
CEACAM1	X	
CHGA	X	
COL15A1	X	
COL18A1	X	
COL4A1	X	
COL4A2	X	
COL4A3	X	
Conexina-43	X	
CSF3	X	
CTGF	X	
CXCL10		X
CXCL12	X	
CXCL2	X	
DLX5		X
DNMT3B	X	
ECGF1	X	
EDG1	X	
EDIL3	X	
ENPP2	X	
EPHB2	X	
F2	X	
FBLN5	X	
FGA		X
FGF1	X	

<b>Marcador de AMDAC</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
FGF2	X	
FGF4		X
FIGF	X	
FLT3		X
FLT4	X	
FN1	X	
FOXC2	X	
Folistatina	X	
Galectina-1	X	
GRN	X	
HEY1	X	
HGF	X	
HLA-G		X
HSPG2	X	
IFNB1	X	
IFNG		X
IL-8	X	
IL-12A	X	
ITGA4	X	
ITGAV	X	
ITGB3	X	
KLF-4	X	
LECT1		X
LEP		X
MDK	X	
MMP-13		X
MMP-2	X	
MYOZ2	X	
NANOG		X
NESTIN		X
NRP2	X	
PDGFB	X	
PF4	X	
PGK1	X	
PLG		X
POU5F1 (OCT-4)		X
PRL		X
PROK1		X
PROX1	X	
PTN	X	
SEMA3F	X	
SERPINB5	X	
SERPINC1	X	
SERPINF1	X	

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
SOX2		X
TERT		X
TGFA	X	
TGFB1	X	
THBS1	X	
THBS2	X	
TIE1	X	
TIMP2	X	
TIMP3	X	
TNF	X	
TNFSF15	X	
TNMD		X
TNNC1	X	
TNNT2	X	
VASH1	X	
VEGF	X	
VEGFB	X	
VEGFC	X	
VEGFR1/FLT-1	X	
XLKD1		X

En un experimento separado, se encontró además que las AMDAC expresaron genes del translocador nuclear 2 del receptor de los aril-hidrocarburos (ARNT2), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), neurotrofina 3 (NT-3), NT-5, factor 1 $\alpha$  inducible por hipoxia (HIF1A), proteína 2 inducible por hipoxia (HIG2), hemoxigenasa (descicladora) 1 (HMOX1), superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn] (SOD3), catalasa (CAT), factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGFB1), receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGFB1R) y receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR/c-Met).

### 6.2.2 Citometría de flujo para la evaluación de células adherentes derivadas del amnios

La citometría de flujo se usó como un método para cuantificar marcadores fenotípicos de las células adherentes derivadas del amnios con el fin de definir la identidad de las células. Se obtuvieron muestras de células de reservas congeladas. Antes de descongelarlas y durante la preparación del reactivo, los viales celulares se mantuvieron en hielo seco. Seguidamente, se descongelaron las muestras rápidamente usando un baño de agua a 37 °C. Se usaron recuentos de células previos a la congelación para el cálculo de las diluciones iniciales dependientes del número de células tras la descongelación. En resumen, se descongelaron crioviales en un baño de agua a 37 °C durante aproximadamente 30 segundos con agitación suave. Inmediatamente después de la descongelación, se añadieron aproximadamente 100-200  $\mu$ l de solución de descongelación fría (2-8 °C) (PBS con albúmina a 2,5 % y Gentran 40 a 5 %) al criovial y se mezclaron. Tras el mezclado suave, se transfirió el volumen total en los crioviales a un tubo cónico de 15 ml que contenía un volumen igual de solución de descongelación fría (2-8 °C). Se centrifugaron las células en un tubo cónico a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de retirar el sobrenadante. Se midió el volumen residual con una pipeta (estimación); se volvieron a suspender el volumen residual y el sedimento celular a temperatura ambiente en FBS a 1 % en PBS para alcanzar una concentración celular de 250 x 10<sup>3</sup> células/100  $\mu$ l de tampón. Por ejemplo, se volvieron a suspender 1 x 10<sup>6</sup> células en 400  $\mu$ l de FBS a 1 %. Se dispuso la suspensión celular en tubos de FACS de 5 ml previamente marcados (Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ). Para cada isotipo de anticuerpo primario, se dividieron en alícuotas 100  $\mu$ l de suspensión celular en un tubo de control de isotipo. Antes del análisis fenotípico, se optimizaron las concentraciones de todos los anticuerpos para lograr una buena relación señal-ruido y la detección adecuada de antígenos DC a través de un posible rango dinámico de cuatro registros. Se determinó el volumen de cada isotipo y anticuerpo de la muestra que se usó para teñir cada muestra. Para estandarizar la cantidad de anticuerpo (en  $\mu$ g) en los tubos de isotipo y de muestra, se calculó la concentración de cada anticuerpo como (1/concentración de anticuerpo real ( $\mu$ g/ $\mu$ l)) x (cantidad final deseada de anticuerpo en  $\mu$ g para 2,5 x 10<sup>5</sup> células) = n.º de  $\mu$ l de anticuerpo añadido. Se preparó una mezcla maestra de anticuerpos tanto para el isotipo como para la muestra añadiendo la cantidad apropiada de anticuerpo a

5 cada tubo. Se tiñeron las células durante 15-20 minutos a temperatura ambiente a oscuras. Tras la tinción, se eliminó el anticuerpo no unido de cada muestra por centrifugación (400 g x 5 minutos) seguido del lavado usando 2 ml de FBS a 1%/PBS (temperatura ambiente) antes de la resuspensión en 150 µl de FBS a 1%/PBS a temperatura ambiente. Entonces, se analizaron las muestras en citómetros de flujo FACSCalibur, FACSCantol o BD FACSCantoll de Becton Dickinson preparados para su uso de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se adquirieron conjuntos de datos de citometría de flujo multiparamétricos (dispersión lateral (SSC), dispersión frontal (FSC) y perfiles de fluorescencia integrados (FL)) sin establecer los parámetros de compensación de instrumentos sobre la marcha. Los parámetros de compensación se determinaron tras la adquisición usando el software FACSDiva de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aplicaron en cada muestra estos ajustes del instrumento. Los conjugados de fluoróforos usados en estos estudios fueron alofococianina (APC), AlexaFluor 647 (AF647), isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y la proteína clorofila peridina (PerCP), todos de BD Biosciences. La Tabla 9 resume la expresión de los marcadores de la superficie celular seleccionados, incluyendo los marcadores angiogénicos.

15 Tabla 9: Expresión de marcadores de la superficie celular en células adherentes derivadas del amnios, según lo determinado mediante citometría de flujo.

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
CD6		X
CD9	X	
CD10	X	
CD31		X
CD34		X
CD44	X	
CD45		X
CD49b	X	
CD49c	X	
CD49d	X	
CD54	X	
CD68	X	
CD90	X	
CD98	X	
CD105	X	
CD117		X
CD133		X
CD143		X
CD144 (VE-cadherina)		X
CD146		X
CD166	X	
CD184		X
CD200	X	
CD202b	X	
CD271		X
CD304	X	
CD309 (VEGFR2/KDR)	X	
CD318	X	
CD349	X	
CytoK	X	

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
HLA-ABC+ B2 Micro+	X	
Cadena invariable+ HLA-DR-DP-DQ+		X
PDL-1	X	
VEGFR1/FLT-1	X	

En otro experimento, se marcaron células AMDAC con CD49f anti-humano (Clon GoH3, conjugado con ficoeritrina; BD Pharmingen Parte n.º 555736) y se analizaron por citometría de flujo. Aproximadamente 96 % de las AMDAC se marcaron con anti-CD49f (es decir, resultaron ser CD49f<sup>+</sup>).

- 5 En otros experimentos, se encontró además, por inmunolocalización, que las AMDAC expresaron CD49a, CD106, CD119, CD130, c-met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; HGFR), receptor de quimiocinas CXC 1 (CXCR1), PDGFRA y PDGFRB por inmunolocalización. También se encontró, por inmunolocalización, que las AMDAC carecían de expresión de CD49e, CD62E, receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), miembro 12A de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF12A), receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1R), CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR6, receptor de quimiocinas 1 (CCR1), CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), receptor de la insulina (CD220), receptor de la interleucina 4 (IL4-R; CD124), IL6-R (CD126), TNF-R1a y 1b (CD120a, b) y erbB2/Her2.

15 **6.2.3 Inmunohistoquímica (IHC)/inmunofluoroquímica (IFC) para la evaluación de la potencia angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios**

Se cultivaron células adherentes derivadas del amnios de paso 6 hasta una confluencia de aproximadamente 70 % en portaobjetos de cámara de 4 pocillos, y se fijaron con una solución de formalina a 4 % durante 30 minutos cada vez. Tras la fijación, se enjuagaron los portaobjetos con PBS dos veces durante 5 minutos. Luego se incubaron los portaobjetos con suero normal a 10 % del mismo hospedador que el anticuerpo secundario, 2 x caseína y Triton X100 a 0,3 % en PBS, durante 20 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se separó el exceso de suero por transferencia y se incubaron los portaobjetos con anticuerpo primario (IgG policlonal de cabra (Santa Cruz; Santa Cruz, CA) en una cámara humidificada. El tiempo y la temperatura de las incubaciones se determinaron mediante la selección de las condiciones óptimas para el anticuerpo que se estaba usando. En general, los tiempos de incubación fueron de 1 a 2 horas a 37 °C o de una noche a 4 °C. Se aclararon los portaobjetos con PBS tres veces durante 5 minutos cada vez y se incubaron durante 20-30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda con anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina conjugado con fluorescente dirigido contra el hospedador del anticuerpo primario (anticuerpo de conejo anti-cabra (Santa Cruz)). Tras ello, se enjuagaron los portaobjetos con PBS tres veces durante 5 minutos cada vez, se montaron con un cubreobjetos utilizando solución de montaje DAPI VECTASHIELD® (Vector Labs) para teñir por contraste los núcleos. La tinción celular se visualizó utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon. Todas las imágenes fueron tomadas en el mismo momento de la exposición normalizadas con respecto al fondo del isotipo correspondiente (IgG de cabra (Santa Cruz)). La Tabla 10 resume los resultados de la expresión de proteínas angiogénicas por las células adherentes derivadas del amnios.

Tabla 10: Marcadores angiogénicos presentes o ausentes en las células adherentes derivadas del amnios.

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
CD31		X
CD34		X
(VEGFR2/KDR)	X	
Conexina-43	X	
Galectina-1	X	
TEM-7	X	

Las células adherentes derivadas del amnios expresaron el marcador endotelial tumoral 7 (TEM-7), una de las proteínas que se muestran en la Tabla 10. Véase la Figura 2.

#### **6.2.4 Proteómica de la membrana para la evaluación de la potencia angiogénica de células adherentes derivadas del amnios**

5 *Purificación de las proteínas de la membrana:* se cultivaron células en el paso 6 hasta una confluencia de aproximadamente 70 % en medio de crecimiento, se trataron con tripsina y se lavaron en PBS. A continuación, se incubaron las células durante 15 minutos con una solución que contenía mezcla de inhibidor de proteasa (P8340, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) antes de la lisis celular. Las células se lisaron luego mediante la adición de una solución de HCl 10 mM (evitando así el uso de detergentes) y se centrifugaron durante 10 minutos a 400 g para que sedimentaran y retirar los núcleos. Se transfirió el sobrenadante post-nuclear a un tubo de ultracentrifugación y se centrifugó usando una ultracentrifugadora WX80 con un rotor T-1270 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC) a 100.000 g durante 150 minutos generando un sedimento de proteínas de membrana.

15 *Generación, inmovilización y digestión de proteoliposomas:* se lavó el sedimento de proteínas de la membrana varias veces usando tampón Nanoxis (Tris 10 mM, NaCl 300 mM, pH 8). Se suspendió el sedimento de proteínas de membrana en 1,5 ml de tampón Nanoxis y luego se sometió a ultrasonidos usando un procesador de ultrasonidos VC505 VIBRA-CELL™ (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT) durante 20 minutos en hielo. Se determinó el tamaño de los proteoliposomas por tinción con colorante FM1-43 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y visualización con microscopia de fluorescencia. La concentración de proteínas de la suspensión de proteoliposomas se determinó mediante un ensayo de BCA (Thermo Scientific). Se inyectaron los proteoliposomas sobre una celda de flujo LPI™ (Nanoxis AB, Gothenburg, Suecia) usando la punta de una pipeta convencional y se permitió la inmovilización durante 1 hora. Tras la inmovilización, se llevó a cabo una serie de etapas de lavado y se inyectó tripsina a 5 µg/ml (Princeton Separations, Adelphi, NJ) directamente en la celda de flujo LPI™. Se incubó el chip durante la noche a 37 °C y se eluyeron los péptidos tripticos del chip LPI™ y después se desalaron usando un cartucho Sep-Pak (Waters Corporation, Milford, MA).

25 *Análisis de LC/MS/MS de trampa de iones lineal LTQ:* se separó cada muestra de digestión triptica en una columna C18 MAGIC de 200 Å de 0,2 mm x 150 mm y 3 µm (Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA) que estaba directamente interconectada a una fuente de ionización por electronebulización por nanocapilares asistida por vacío de desolvatación axial (ADVANCE) (Michrom Bioresources, Inc.) usando un gradiente de 180 minutos (tampón A: agua, ácido fórmico a 0,1 %; tampón B: acetonitrilo, ácido fórmico a 0,1 %). La fuente ADVANCE logra una sensibilidad que es comparable a la nanoESI tradicional mientras funciona a un caudal considerablemente superior de 3 µl/min. Los péptidos eluidos se analizaron en un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal LTQ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) que empleó diez exploraciones de MS/MS dependientes de los datos tras cada espectro de masas de exploración completo. Se obtuvieron siete conjuntos de datos analíticos por cada muestra biológica.

35 *Bioinformática:* se realizaron búsquedas en siete archivos RAW correspondientes a los 7 conjuntos de datos analíticos obtenidos para cada línea celular en una sola búsqueda frente a la base de datos humana IPI usando una implementación del algoritmo SEQUEST en una estación de trabajo Solo™ Sorcerer (Sage-N Research, San Jose, CA). Se especificó una tolerancia de masa peptídica de 1,2 uma, se especificó la oxidación de la metionina como una modificación diferencial y se especificó la carbamidometilación como una modificación estática. Se usó la aplicación del software para armazones del conducto trans-proteómico (TPP) para clasificar y analizar los datos proteómicos de la membrana. Las proteínas se consideraron para el análisis si se identificaron con una probabilidad de péptido de 95 %, probabilidad de proteína de 95 % y 1 un único péptido. Se realizaron comparaciones entre los conjuntos de datos proteómicos de la membrana usando programas Perl personalizados desarrollados internamente.

45 *Resultados:* como se muestra en la Tabla 11, las células adherentes derivadas del amnios expresaron diversos marcadores angiogénicos y cardiomiogénicos.

Tabla 11: Marcadores cardiomiogénicos o angiogénicos expresados por las células adherentes derivadas del amnios.

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
Receptor de activina de tipo IIB	X	
ADAM 17	X	
Alfa-actinina 1	X	

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
Angiotensinógeno	X	
Filamina A	X	
Receptor I y II de LDL acetilado de macrófagos	X	
Megalina	X	
Cadena pesada de miosina no muscular de tipo A	X	
Proteína C de unión a la miosina de tipo cardíaco	X	
Wnt-9	X	

#### 6.2.5 Perfiles de evaluación de la potencia angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios del secretoma

5 *Matrices de proteínas:* se sembraron células adherentes derivadas del amnios en el paso 6 a igual número de células en medio de cultivo, y se recogieron los medios acondicionados tras 4 días. Se realizó el análisis cualitativo simultáneo de múltiples citocinas/factores de crecimiento angiogénicos en los medios acondicionados de células usando matrices de proteínas de angiogénesis RayBiotech (Norcross, GA). En resumen, se incubaron las matrices de proteínas con 2 ml de 1 x tampón de bloqueo (Ray Biotech) a temperatura ambiente durante 30 minutos (min) para bloquear las membranas. Seguidamente, se decantó el tampón de bloqueo y se incubaron las membranas con 10 1 ml de muestra (medio de crecimiento acondicionado por las respectivas células durante 4 días) a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas. Luego se decantaron las muestras y se lavaron las membranas 3 veces durante 5 min cada vez con 2 ml de 1 x tampón de lavado I (Ray Biotech) a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se lavaron las membranas 2 veces durante 5 min cada vez con 2 ml de 1 x tampón de lavado II (Ray Biotech) a temperatura ambiente con agitación. Tras ello, se añadió 1 ml de anticuerpos conjugados con biotina diluidos (Ray Biotech) a cada membrana y se incubaron a temperatura ambiente durante 1-2 horas, y se lavaron con los tampones de lavado como se ha descrito anteriormente. Entonces, se añadió estreptavidina conjugada con HRP diluida (2 ml) a cada membrana y se incubaron las membranas a temperatura ambiente durante 2 horas. Por último, se lavaron las membranas de nuevo, se incubaron con el kit de detección ECL™ (Amersham) de acuerdo con las especificaciones, y los resultados se visualizaron y se analizaron usando el sistema de imágenes Gel Logic 2200 de Kodak. En la 20 Figura 3, se muestra la secreción de diversas proteínas angiogénicas por las AMDAC.

25 *Ensayos de ELISA:* se realizó el análisis cuantitativo de las citocinas/factores de crecimiento angiogénicos individuales en medio acondicionado de células usando kits disponibles en el mercado de R & D Systems (Minneapolis, MN). En breve, los ensayos de ELISA se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y la cantidad de los respectivos factores de crecimiento angiogénicos en el medio acondicionado se normalizó con respecto a  $1 \times 10^6$  células. Las células adherentes derivadas del amnios ( $n = 6$ ) presentaron aproximadamente 4.500 pg de VEGF por millón de células, y aproximadamente 17.200 pg de IL-8 por millón de células.

Tabla 12: Resultados del ELISA para los marcadores angiogénicos

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
ANG	X	
EGF	X	
ENA-78	X	
FGF2	X	
Folistatina	X	

Marcador de AMDAC	Positivo	Negativo
G-CSF	X	
GRO	X	
HGF	X	
IL-6	X	
IL-8	X	
Leptina	X	
MCP-1	X	
MCP-3	X	
PDGFB	X	
PLGF	X	
Rantes	X	
TGFB1	X	
Trombopoyetina	X	
TIMP1	X	
TIMP2	X	
uPAR	X	
VEGF	X	
VEGFD	X	

En un experimento separado, se confirmó que las AMDAC también secretaron angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, PECAM-1 (CD31; molécula de adhesión a células endoteliales plaquetarias), laminina y fibronectina. Otros experimentos confirmaron que las AMDAC además secretaron metaloproteína matricial (MMP) 1, MMP7, MMP9 y MMP10.

#### 6.2.6 Expresión de micro ARN de AMDAC

El presente Ejemplo demuestra que las AMDAC expresan niveles superiores de ciertos micro ARN (miARN) y niveles inferiores de otros ciertos miARN, cada uno de los cuales se correlacionó con la función angiogénica, en comparación con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

Se sabe que el miR-296 proangiogénico regula la función angiogénica a través de niveles de regulación de los receptores de factores de crecimiento. Por ejemplo, miR-296, en las células endoteliales, contribuye significativamente a la angiogénesis mediante la dirección directa del ARNm del sustrato de tirosina quinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGS), que conduce a la reducción de los niveles de HGS, reduciendo de ese modo la degradación mediada por HGS de los receptores del factor de crecimiento VEGFR2 y PDGFRb. Véase Würdinger *et al.*, *Cancer Cell*. 14: 382-393 (2008). Además, miR-15b y miR-16 han demostrado controlar la expresión de VEGF, un factor proangiogénico clave implicado en la angiogénesis, y que la reducción inducida por la hipoxia de miR-15b y miR-16 contribuye a un aumento de VEGF, una citocina proangiogénica. Véase Kuelbacher *et al.*, *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(1): 12-15 (2007).

Se prepararon AMDAC según lo descrito en el Ejemplo 1 anterior. Se sometieron células AMDAC y BM-MS (usadas como comparadores) a la preparación de micro ARN (miARN) usando un kit de aislamiento de miARN Mirvana™ (Ambion, n.º de cat. 1560). Se perturbaron de  $0,5 \times 10^6$  a  $1,5 \times 10^6$  células en un tampón de lisis de desnaturalización. A continuación, se sometieron las muestras a extracción con ácido-fenol + cloroformo para aislar el ARN altamente enriquecido en especies de ARN pequeñas. Se añadió etanol a 100 % para llevar las muestras hasta etanol a 25 %. Cuando se pasó esta mezcla de lisado/etanol a través de un filtro de fibra de vidrio, se inmovilizaron los ARN de gran tamaño, y las especies de ARN pequeñas se recogieron en el material filtrado. Entonces, se aumentó la concentración de etanol del material filtrado hasta 55 %, y se pasó la mezcla a través de un segundo filtro de fibra de vidrio, en el que los ARN pequeños quedaron inmovilizados. Se lavó este ARN, y se eluyó en una solución de baja fuerza iónica. Se determinó la concentración y la pureza del ARN pequeño recuperado midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm.

Se encontró que las AMDAC expresaron el siguiente miARN angiogénico: miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, (miembros del grupo de miARN angiogénicos 17-92), miR-296, miR-221, miR-222, miR-



15b, miR-16. También se encontraron que las AMDAC expresaron niveles más altos del siguiente miARN angiogénico en comparación con las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSC): miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92 (miembros del grupo de miARN angiogénicos 17-92), miR-296. Estos resultados se correlacionan bien con la observación de que las AMDAC expresan altos niveles de VEGFR2/KDR (véase más arriba). Por el contrario, no se encontró que las AMDAC expresaran niveles más bajos del siguiente miARN angiogénico en comparación con las BM-MSC: miR-20a, miR-20b, (miembros del grupo de miARN angiogénicos 17-92), miR-221, miR-222, miR-15b, miR-16. La menor expresión de miR-15b y miR-16 se correlacionó con los niveles más altos de expresión del VEGF observados en las AMDAC.

### 6.3 EJEMPLO 3: DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIO

#### 6.3.1 Ejemplo 3.1: Ausencia de diferenciación osteogénica de células adherentes derivadas del amnios

El presente ejemplo demuestra que las células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) no se diferencian en células osteogénicas, de acuerdo con lo establecido, por ejemplo, mediante la tinción de von Kossa, que tiñe la mineralización, por ejemplo, el calcio depositado por las células.

Se descongelaron AMDAC OCT-4<sup>-</sup> crioconservadas, obtenidas según lo descrito en el Ejemplo 1 anterior, se lavaron para eliminar el dimetilsulfóxido (DMSO) y se volvieron a suspender en medio de crecimiento. Se sembraron las células a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos y placas de 6 pocillos en medio de crecimiento, y se incubaron durante una noche. Seguidamente, se retiró el medio y se reemplazó por medio osteogénico que comprendía DMEM-bajo en glucosa, suero bovino fetal a 10 % v/v (FBS), beta-glicerofosfato 10 mM (Sigma), dexametasona 100 nM (Sigma), sal de fosfato de ácido ascórbico 100 µM (Sigma), Fungizone (Gibco), 50 unidades/ml de penicilina, y 50 µg/ml de estreptomina (Gibco). Se complementó el medio osteogénico con 20 ng/ml de factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1) (Sigma) y 40 ng/ml de proteína 2 morfogenética ósea recombinante humana (BMP-2) (Sigma). Se siguió cultivando las AMDAC en medio osteogénico durante un total de 28 días con cambios de medio cada 3-4 días. Al final del período de cultivo, se recogieron las células, se lavaron y se tiñeron como se detalla a continuación para la evaluación de la mineralización, un indicador o la diferenciación osteogénica. Cuando se observa bajo el microscopio, la capa de células fue completamente confluyente con la morfología fibroblastoide (por ejemplo, de aspecto no cuboidal), sin la observación de nódulos.

Como controles, también se cultivaron en el medio osteogénico fibroblastos dérmicos y células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSC). Los fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) de adulto se adquirieron en Lonza (Walkersville, MD, EE.UU.) y los NHDF neonatales se adquirieron en la ATCC (Manassas, VA, EE.UU.). Se evaluaron tres líneas de BM-MSC de distinto origen: una de ScienCell Laboratories (Carlsbad, CA, EE.UU.), una segunda de Lonza (Walkersville, MD, EE.UU.), y se aisló una tercera de aspirados de médula ósea normal entera recién realizados, obtenidos en AllCells (Emeryville, CA, EE.UU.).

Se fijaron las células con metanol tamponado neutro a 10 % (v/v). Tras la fijación, se lavaron las células en agua desionizada y se incubaron en nitrato de plata a 5 % (Aldrich) durante 1 hora bajo luz UV indirecta. A continuación, se lavaron las células en agua desionizada y se incubaron en tiosulfato de sodio a 5 % (p/v) durante 5 minutos. Después, se volvieron a lavar las células en agua destilada y se examinaron por microscopía óptica.

Se evaluaron los niveles de expresión diferencial de los genes relacionados con la diferenciación osteogénica sialoproteína ósea (IBSP) y osteocalcina (BGLAP), antes y después de la inducción, por RT-PCR. En concreto, se recibieron las AMDAC al final del ensayo de diferenciación osteogénica, y luego se lisaron usando tampón de lisis RLT (Qiagen). Los lisados celulares se almacenaron a -80 °C. Se descongelaron los lisados celulares de AMDAC, y se aisló el ARN usando un kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el tratamiento con ADNasa. A continuación, se eluyó el ARN con agua tratada con DEPC, y se determinó la cantidad de ARN usando un espectrofotómetro Nanodrop ND1000. Se preparó ADNc a partir del ARN usando reactivos de transcripción inversa de Applied Biosystems. Se realizaron reacciones de PCR en tiempo real usando mezcla maestra de PCR universal Taqman de Applied Biosystems. Los ensayos de expresión génica Taqman usados fueron sialoproteína ósea Hs00173720, osteocalcina Hs00609452 y GAPDH. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un sistema ABI 7300 como se muestra a continuación:

Fase	Repeticiones	Temperatura	Tiempo	Velocidad de la rampa
1	1	50,0 °C	2:00	100
2	1	95,0 °C	10:00	100
3	40	95,0 °C	0:15 por	100
		60,0 °C	1:00 por	100

Interpretación de los valores del ciclo umbral (Ct):

Ct 1-10 medio, expresión muy alta

Ct 20-20 medio, expresión alta

Ct 20-30 medio, expresión de nivel medio

Ct 30-35 medio, expresión baja

Ct 35-40 medio, expresión muy baja

Se normalizaron los valores de expresión (Ct) de cada gen con respecto los del gen constitutivo GAPDH. Se compararon los valores de expresión normalizados (dCt) de cada muestra antes y después de la inducción. Las diferencias relativas, en términos veces de cambio, se presentaron como "RQ". Debido a la variabilidad típica de dCt de los genes constitutivos, se consideró irrelevante cualquier diferencia en las veces de inducción inferior a 3.

- 5 **Resultados:** los resultados de la tinción de Von Kossa demostraron que las AMDAC resultaron ser claramente no osteogénicas, pues no se detectó tinción de von Kossa. Los fibroblastos de control mostraron una mineralización mínima, mientras que las BM-MSC presentaron varios grados de mineralización.

Tabla 13: Resultados de la tinción de von Kossa

Tipo de célula	ID del donante	Intensidad de la tinción de von Kossa
AMDAC	1	- (Negativa)
AMDAC	2	- (Negativa)
Fibroblasto dérmico de adulto normal	3	+ (En el límite entre positiva y negativa)
Fibroblasto dérmico neonatal normal	4	- (Negativa)
MSC de médula ósea	5	++++ (Positiva)
MSC de médula ósea	6	++ (Positiva)
MSC de médula ósea	7	+ (en el límite entre positiva y negativa)

- 10 Con respecto a la expresión génica, todas las células ensayadas mostraron expresión basal moderada de la osteocalcina (Ct 27,5-30,9). Las AMDAC demostraron una inducción marginal (< al doble) de la expresión de la osteocalcina que se consideró irrelevante en comparación con la inducción de la expresión de la osteocalcina observada para los fibroblastos o las BM-MSC. Como tal, la inducción de la expresión de la osteocalcina por parte de las AMDAC no fue indicativo del potencial osteogénico. Por el contrario, 2 de cada 3 líneas de BM-MSC mostraron una regulación positiva sustancial tras la inducción. La variación en las BM-MSC para la inducción de la sialoproteína ósea se debe posiblemente a la variación de los donantes.
- 15

Tabla 14: Resultados de expresión génica

Tipo de célula	ID del donante	Condición	Ct de BGLAP	Media de dCt	Desv. Típica de dCt	Veces de inducción	Ct de GAPDH
<b>BGLAP (Osteocalcina)</b>							
AMDAC	2	Basal	28,2	10,2	0,07	1,6	18,0
		Inducida	29,2	9,5	0,12		19,7
Fibroblasto	3	Basal	28,2	10,0	0,11	0,8	18,2
		Inducida	28,4	10,4	0,12		18,0
	4	Basal	29,5	10,8	0,24	0,6	18,6
		Inducida	30,7	11,6	0,18		19,1
BM-MSC	5	Basal	27,7	9,9	0,09	0,3	17,8
		Inducida	30,9	11,7	0,14		19,1
	6	Basal	27,5	9,9	0,12	0,3	17,6
		Inducida	29,8	11,6	0,07		18,3
	7	Basal	27,0	9,5	0,10	0,3	17,6
		Inducida	29,8	11,0	0,16		18,7
<b>IBSP (Sialoproteína ósea)</b>							
AMDAC	2	Basal	>40	17,7	0,10	0,13	18,0
		Inducida	38,6	20,6	0,12		19,7
Fibroblasto	3	Basal	35,8	ND	0,11	NA	18,2
		Inducida	38,6	18,9	0,12		18,0
	4	Basal	>40	ND	0,24	NA	18,6
		Inducida	38,2	19,1	0,18		19,1

Tipo de célula	ID del donante	Condición	Ct de BGLAP	Media de dCt	Desv. Típica de dCt	Veces de inducción	Ct de GAPDH
BM-MSC	5	Basal	33,6	15,8	0,09	0,066	17,8
		Inducida	38,9	19,7	0,14		19,1
	6	Basal	35,7	18,1	0,12	4405	17,6
		Inducida	24,2	6,0	0,07		18,3
	7	Basal	32,5	15,0	0,10	1508	17,6
		Inducida	23,1	4,4	0,16		18,7

ND - No detectado

NA - Imposible de calcular porque no se detectó la condición no inducida (es decir, sin valor de Ct determinable).

Los valores de veces de inducción de 3 o inferiores presentados en la Tabla 14 se consideraron irrelevantes debido a la variabilidad de la expresión de los genes constitutivos usados como comparadores. Por lo tanto, basándose en los resultados anteriores, se concluyó que las AMDAC no presentan potencial osteogénico.

### 6.3.2 Ejemplo 3.2: Ausencia de diferenciación condrogénica de células adherentes derivadas del amnios

El presente Ejemplo demuestra que las células adherentes derivadas del amnios, según lo descrito en el presente documento, no se diferencian a lo largo de una vía condrogénica.

Se usaron AMDAC OCT-4<sup>-</sup> según lo descrito en el presente documento en un ensayo de la condrogénesis, junto con fibroblastos dérmicos y BM-MSC como controles. Para cada muestra de ensayo, se colocaron  $0,25 \times 10^6$  células en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente para formar un sedimento esférico. Se cultivaron los sedimentos bien en medio de inducción condrogénica (medio de condrocitos de Lonza (Lonza PT-3003)) que contenía TGF beta-3 (10 ng/ml), factor 5 de crecimiento/diferenciación humano recombinante (rhGDF-5) (500 ng/ml) o una combinación de TGF beta-3 (10 nanogramos/mililitro) y rhGDF-5 (500 ng/ml) o en medio de crecimiento (DMEM-bajo en glucosa (Gibco) + FBS (2 % v/v) (Hyclone) + penicilina y estreptomycin) durante tres semanas. Durante el cultivo, se realizaron intercambios completos de los medios dos veces a la semana.

Al final del período de cultivo, se fijaron los sedimentos celulares en formalina a 10 % durante 24 horas. A continuación, se deshidrataron todas las muestras a través de alcoholes graduados y se incluyeron en parafina. Se crearon cortes de un espesor de 5 µm y luego se tiñeron de acuerdo con protocolos descritos a continuación. Los cortes histológicos se examinaron usando microscopía óptica.

Tinción con Azul de Alcian: cuando se usa en una solución de ácido acético a 3 % (pH 2,5), el azul de Alcian tiñe los mucopolisacáridos ácidos tanto sulfatados como carboxilados y las sialomucinas sulfatadas y/o carboxiladas. Se usó azul de Alcian a 1 % (Sigma-Aldrich n.º 23655-1) en ácido acético a 3 %, seguido de una tinción de contraste con rojo rápido nuclear a 0,1 % (Sigma-Aldrich n.º 22911-3). En resumen, los cortes se desparafinaron y se hidrataron a través de alcoholes graduados hasta agua destilada, se tiñeron de azul de Alcian durante 30 minutos, se lavaron en agua corriente durante dos minutos, se enjuagaron en agua destilada, luego se tiñeron por contraste en solución de rojo rápido nuclear durante 5 minutos, se lavaron en agua corriente durante 1 minuto, se deshidrataron a través de alcoholes graduados, se aclararon en xileno y, finalmente, se montaron con medio de montaje resinoso.

Tinción de colágeno de tipo II: la presencia del colágeno de tipo II en muestras de cultivo celular antes y después de las condiciones de diferenciación condrogénica se evalúa por inmunohistoquímica como se indica a continuación. La producción de colágeno II por las células se evaluó usando anticuerpo 5B2.5 (n.º de cat. Abcam Ab3092), un anticuerpo monoclonal de ratón altamente específico del colágeno de tipo II y que no muestra ninguna reacción cruzada con los colágenos de tipo I, III, IV, V, VI, IX, X o XI, ni ninguna reacción cruzada con el colágeno de tipo II digerido con pepsina. El ensayo usó AF 594 de cabra anti-ratón (Invitrogen IgG2a, n.º de cat. A21135) como anticuerpo secundario. Los sedimentos celulares se fijaron en formalina a 10 % durante un mínimo de 4 horas a toda la noche y se infiltraron en parafina.

Se lavaron todas las muestras de células en PBS y se expusieron a solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra a 4 % y Triton-100X a 0,3 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces, se aplicaron los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo (1:50 y 1:100) durante la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, se lavaron las muestras en PBS, y se aplicaron los anticuerpos secundarios (AF594 de cabra anti-ratón) diluidos en solución de bloqueo (1:500) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las células en PBS, y se aplicó solución de DAPI 600 nM durante 10 minutos a temperatura ambiente para visualizar los núcleos.

Las BM-MSC y los fibroblastos formaron sedimentos celulares en medio de inducción condrogénica. Los condrocitos formaron sedimentos celulares de gran tamaño sin poblaciones de células distintas apical o centralmente. Por el

contrario, las AMDAC no formaron sedimentos celulares durante el período de cultivo. No se obtuvieron resultados de tinción para las AMDAC, bien para el colágeno II o el azul de Alcian, porque las AMDAC no formaron sedimentos celulares. Por lo tanto, se concluyó que las AMDAC no son condrogénicas.

### 6.3.3 Ejemplo 3.3: Diferenciación neuronal de las células adherentes derivadas del amnios

5 El presente ejemplo demuestra que las células adherentes derivadas del amnios se pueden diferenciar en células con características de células neuronales. Se comparó la diferenciación neuronal de las AMDAC con la de los neuroprogenitores humanos normales (Lonza), fibroblastos dérmicos neonatales normales (donante 3), MSC de la médula ósea (donantes 5 y 6).

10 En un primer procedimiento de diferenciación neuronal a corto plazo, se descongelaron AMDAC y las otras células, y se expandieron en sus respectivos medios de cultivo tras la siembra a aproximadamente 5.000/cm<sup>2</sup> hasta la subconfluencia. Se trataron las células con tripsina y se sembraron a 6.000 células por pocillo en placas recubiertas de cultivo tisular. Todas las células se expandieron inicialmente durante 4 días en medio DMEM/F12 (Invitrogen) que contenía FBS a 15 % v/v (Hyclone), con factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a 20 ng/ml, factor de crecimiento epidérmico (EGF) a 20 ng/ml (Peprotech) y penicilina/estreptomina (PenStrep, Invitrogen). Tras 4 días, se enjuagaron las células en PBS (Invitrogen). Se cultivaron las células en DMEM/F12 con FBS a 20 % v/v, PenStrep durante aproximadamente 24 horas. Tras 24 horas, se lavaron las células con PBS (Invitrogen) y se cultivaron en medio de inducción que consistía en DMEM/F12, exento de suero, que contenía hidroxianisól butilado 200 mM, cloruro de potasio 10 nM, 5 mg/ml de insulina, forskolina 10 nM, ácido valproico 4 nM e hidrocortisona 2 nM (Sigma). Seguidamente, se fijaron las células a -20 °C con metanol a 100 %. A continuación, se evaluaron las muestras fijadas por inmunohistoquímica (IHC) para determinar la expresión de la nestina humana usando un anticuerpo anti-nestina (Alexa-Fluor 594 (rojo) conjugado), con tinción de contraste con DAPI para núcleos.

20 En un segundo protocolo de diferenciación neuronal a corto plazo, se expandieron todas las células inicialmente durante 4 días en medio DMEM/F12 (Invitrogen) que contenía FBS a 15 % (Hyclone), con FGF básico a 20 ng/ml, EGF a 20 ng/ml y PenStrep (Invitrogen). Tras 4 días, las células se enjuagaron en PBS (Invitrogen) y se cultivaron en DMEM/F12 con FBS a 20 % v/v, PenStrep. Tras 24 horas, se enjuagaron las células con PBS. A continuación, se cambiaron los medios a medio de expansión de progenitor neuronal (NPE), que comprendía medio basal NEUROBASAL™-A (Gibco), con B27 (Gibco), L-glutamina 4 mM, ácido retinoico 1 µM (Sigma) y PenStrep. Tras cuatro días, se retiró el medio de cada pocillo y se fijaron las células con paraformaldehído a 4 % p/v enfriado con hielo de durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se evaluaron las muestras fijadas por IHC para la expresión de GFAP (proteína ácida fibrilar glial) para el fenotipo de astrocitos, y Tuj1 (tubulina de clase III específica de las neuronas) para el fenotipo neuronal, respectivamente.

30 En el primer protocolo de diferenciación, todos los tipos de células se transformaron en un tipo de célula con morfología bipolar y se tiñeron positivamente con nestina. Como era de esperar, los neuroprogenitores expresaron constitutivamente nestina. En el segundo protocolo de diferenciación, se evaluó la expresión de marcadores relacionados con las neuronas (Tuj1) y relacionados con los astrocitos (GFAP). Tras la inducción, las AMDAC y las BM-MSc expresaron bajos niveles de Tuj1. La expresión en los fibroblastos resultó estar en el límite entre positiva y negativa, lo que podría deberse al fondo. Las AMDAC, y una línea de células BM-MSc, mostraron un bajo nivel de expresión de GFAP. Como era de esperar, la línea celular de control positivo (neuroprogenitores) expresó constitutivamente tanto Tuj1 como GFAP.

40 Por lo tanto, las AMDAC son capaces, en condiciones de inducción neuronal, de presentar cambios morfológicos y bioquímicos coincidentes con la diferenciación neuronal.

### 6.4 EJEMPLO 4: INMUNOMODULACIÓN USANDO CÉLULAS ANGIOGÉNICAS DERIVADAS DEL AMNIO

El presente ejemplo demuestra que las AMDAC presentan función inmunosupresora *in vitro* en un ensayo que utiliza linfocitos T estimulados con perlas.

#### 45 6.4.1 Supresión mediada por AMDAC de la proliferación de los linfocitos T

Las AMDAC se obtuvieron según lo descrito en el Ejemplo 1 anterior. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se obtuvieron a partir de sangre periférica humana.

50 Se marcaron los linfocitos T con succinimidiléster de carboxifluoresceína (CFSE) y se mezclaron con Dynabeads recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28, seguido del cultivo en ausencia de AMDAC o un cultivo conjunto de las AMDAC de una manera que permitiera el contacto entre células, también conocido como reacción de linfocitos T con las perlas (BTR). El cultivo conjunto con las AMDAC se realizó mezclando 100.000 linfocitos T con Dynabeads recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28 (Invitrogen) a una proporción de perla:linfocitos T de 1: 3 en un pocillo de una placa de 96 pocillos, en presencia o ausencia de 20.000 células AMDAC. Los cultivos celulares mezclados (cultivo conjunto) y sin mezclar se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5 % y 90 % de humedad relativa durante 5 días. Los fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF), que no poseen actividad inhibidora de linfocitos T sustancial se usaron como un control negativo, y se sometieron a las mismas condiciones que las AMDAC.

Tras los 5 días, se detectó la fluorescencia de CFSE en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> mediante citometría de flujo, y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de linfocitos T en función del aumento de la fracción de linfocitos T no proliferados (alto nivel de CFSE) en comparación con el cultivo de los linfocitos T marcados con CFSE que no se habían cultivado conjuntamente con AMDAC o NHDF. Como se demuestra en la Figura 4, las AMDAC inhiben la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> *in vitro*, lo que indica que las AMDAC son inmunomoduladoras.

#### 6.4.2 Los medios acondicionados por AMDAC inhiben la secreción de TNF-alfa por los linfocitos T

Las AMDAC se obtuvieron según lo descrito en el Ejemplo 1 anterior. Los linfocitos T se obtuvieron a partir de sangre periférica humana.

Se sembraron las AMDAC en placas de cultivo tisular y se incubaron durante la noche para formar una monocapa adherente. Al día siguiente, se estimuló el cultivo de AMDAC con IL-1 beta, que previamente había demostrado ser un potente inductor de factores antiinflamatorios derivados de AMDAC. Tras 16 h de estimulación de IL-1 beta, se recogió el medio acondicionado con las AMDAC y se mezcló en una proporción en volumen de 9:1 con los linfocitos T de sangre periférica humanos recubiertos con Dynabeads recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28. Como control, se mantuvo una población independiente de linfocitos T de sangre periférica humanos recubiertos con Dynabeads recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28. Se incubaron los linfocitos T mezclados con medio acondicionado con AMDAC y la población sin mezclar de los linfocitos T a 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5 % y 90 % de humedad relativa durante 72 h. El medio acondicionado con fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF), que no posee actividad inhibitoria del TNF-alfa sustancial se usó como control negativo, y se sometió a las mismas condiciones que las AMDAC.

Tras el cultivo de 72 h, se midió la concentración de TNF-alfa derivado de linfocitos T de los sobrenadantes de cultivo de linfocitos T usando un método ELISA basado en perlas de citometría. El porcentaje de supresión de la secreción de TNF-alfa se calculó basándose en la reducción de la concentración de TNF-alfa en presencia de medio acondicionado con AMDAC en comparación con el cultivo de linfocitos T de control que no se había mezclado con medio acondicionado con AMDAC. Como se demuestra en la Figura 5, el cultivo de los linfocitos T en presencia de medio acondicionado con AMDAC indujo la supresión de la producción del TNF-alfa derivado de los linfocitos T.

### 6.5 EJEMPLO 5: LAS AMDAC MODULAN EL COMPARTIMIENTO DE LOS LINFOCITOS T

El presente ejemplo demuestra que las células adherentes derivadas del amnios (AMDAC), obtenidas según lo descrito en el Ejemplo 1, son capaces de influir en el sesgo en los subconjuntos de Th1, Th17 y FoxP3 T<sub>reg</sub>.

#### 6.5.1 Métodos

##### 30 Ensayos de proliferación de linfocitos T

Se realizaron reacciones de linfocitos mixtas (MLR) mediante la mezcla de 100.000 linfocitos T marcados con succinimidiléster de carboxifluoresceína (CFSE) HLA incompatibles con 10.000 células dendríticas maduras (mDC) en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo plano FALCON (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) en presencia o ausencia de 20.000 células AMDAC, aisladas según lo descrito en el Ejemplo 1 anterior. Se incubó el cultivo celular mixto a 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5 % y 90 % de humedad relativa durante 6 días. Al sexto día, se extrajeron todas las células y se tiñeron con PE anti-CD4 y APC anti-CD8 (R & D Systems, Minneapolis, MN).

Se realizaron reacciones de linfocitos T con perlas (BTR) mezclando 100.000 linfocitos T con Dynabeads recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28 (Invitrogen) a una proporción de perla:linfocitos T de 1: 3 en un pocillo de una placa de 96 pocillos. Se realizó la reacción BTR en presencia o ausencia de 20.000 células AMDAC. Se incubó el cultivo celular mixto a 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5 % y 90 % de humedad relativa durante 6 días. Al sexto día, se extrajeron todas las células y se tiñeron con PE anti-CD4 y APC anti-CD8 (R & D Systems, Minneapolis, MN).

Se midió la proliferación de los linfocitos T mediante el análisis de la intensidad de fluorescencia de CFSE en las células positivas CD4 y CD8 individuales con una máquina de FACS Canto II (BD, Franklin Lake, NJ). Todos los datos de FACS de este estudio se analizaron usando el software flowjo 8.7.1 (Tree Star, InC. Ashland OR).

##### 45 Sesgo de linfocitos T (polarización)

El sesgo de Th1 se llevó a cabo usando reacciones BTR con un cóctel de citocinas de sesgo de Th1 adicional que contenía IL-2 (200 UI/ml), IL-12 (2 ng/ml) y anti-IL-4 (0,4 µg/ml).

Para el sesgo de Th17, se estimularon 5 x 10<sup>5</sup> linfocitos T totales con 5 x 10<sup>5</sup> monocitos CD14<sup>+</sup> clasificados, 50 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 (BD Biosciences) y 100 ng/ml de LPS (Sigma Aldrich) bien en presencia o en ausencia de 50.000 AMDAC para 6 días. La población de linfocitos Th17 se analizó mediante tinción intracelular de citocinas (ICCS), la tinción de IL-17 en la población CD4 positiva.

Tinción intracelular citocinas y Foxp3

El subconjunto de linfocitos Th1 se enumeró de la siguiente manera. Se reactivaron los linfocitos T de las reacciones BTR con 50 ng/ml de acetato de miristato de forbol (PMA) y 750 ng/ml de ionomicina (PI) (Sigma Aldrich) durante 5 horas. Se añadió GOLGISTOP™ (Becton Dickinson; un inhibidor del transporte de proteínas) durante las 3 últimas horas. Se tiñeron luego las células superficialmente con anticuerpo anti-CD4 marcado con PE y, posteriormente, con anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  conjugado con APC con el kit Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para enumerar el subconjunto de linfocitos Th17, se reactivaron los linfocitos T de una reacción de activación de sesgo de Th17 con 50 ng/ml de PMA y 750 ng/ml de ionomicina (Sigma Aldrich) durante 5 horas con GOLGISTOP™ (Becton Dickinson) presente durante las 3 últimas horas. Después, se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD4 marcado con PE y, posteriormente, con anticuerpo anti-IL-17 conjugado con APC con el kit Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para enumerar el subconjunto de linfocitos Treg, se tiñeron los linfocitos T de las reacciones BTR superficialmente con anticuerpo anti-CD4 marcado con PE y, posteriormente, con anticuerpo anti-Foxp3 conjugado con APC usando el kit de tinción de Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Diferenciación y estimulación de células dendríticas

Se generaron DC inmaduras (iDC) a partir de una población de monocitos CD14<sup>+</sup> clasificada magnéticamente mediante diferenciación dirigida por mitógenos. En resumen, se obtuvieron iDC de monocitos cultivados a  $1 \times 10^6$ /ml con GM-CSF (20 ng/ml) e IL-4 (40 ng/ml) durante 4 días. Entonces, se estimularon las iDC ( $1 \times 10^5$  células) con 1  $\mu$ g/ml de LPS durante 24 horas en ausencia o presencia de  $1 \times 10^5$  AMDAC en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos FALCON (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Se recogió el sobrenadante del cultivo y se analizó el perfil de citocinas mediante matriz de perlas citométricas (CBA).

Análisis de matriz de perlas citométricas (CBA)

Se midieron las concentraciones de citocinas en sobrenadantes de cultivo usando el sistema de matriz de perlas citométricas (CBA; Becton Dickinson) para la detección cuantitativa simultánea de múltiples analitos solubles de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron las muestras de sobrenadantes del cultivo BTR con una mezcla de perlas de captura para la detección específica de las siguientes citocinas producidas por los linfocitos T activados: IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF, linfotoxina-alfa (LT- $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$ . Seguidamente, se acoplaron las citocinas unidas a las perlas con reactivos de detección marcados con fluorescencia, y se detectaron usando el citómetro de flujo FACS Canto II siguiendo los protocolos del fabricante. Los datos se adquirieron y se analizaron usando el software FACS-DIVA 6.0 (Becton Dickinson), seguido del cálculo de las concentraciones de citocinas usando el programa FCAP Array 1.0 (Becton Dickinson).

ELISA de IL-21

Se midió la IL-21 soluble del sobrenadante obtenido de cultivos de sesgo de Th17 con el kit ELSAI de IL-21 de eBioscience (88-7216) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ensayo de proliferación de NK y ensayo de citotoxicidad de NK

Se aislaron linfocitos NK humanos de PBMC usando un kit de aislamiento de linfocitos NK (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la proliferación de los linfocitos NK mediante el cultivo de  $2,5 \times 10^5$  linfocitos NK en 1 ml de IMDM que contenía suero bovino fetal (FBS) a 10 % (Hyclone) complementado con 35  $\mu$ g/ml de transferrina, 5  $\mu$ g/ml de insulina, etanolamina 20  $\mu$ M, 1  $\mu$ g/ml de ácido oleico, 1  $\mu$ g/ml de ácido linoleico, 0,2  $\mu$ g/ml de ácido palmítico, 2,5  $\mu$ g/ml de BSA, 0,1  $\mu$ g/ml de PHA (Sigma-Aldrich) y 200 UI/ml de IL-2 (R & D), junto con células alimentadoras tratadas con mitomicina C (16 g/ml) (bien  $1 \times 10^6$  PBMC alogénicas humanas o  $1 \times 10^5$  células K562). Se incubaron las células a 37 °C en CO<sub>2</sub> a 5 % con la adición de un volumen igual de IMDM (FBS a 10 %, suero humano a 2 % y 400 UI/ml de IL-2) cada 3 días. Se determinó el número de linfocitos NK mediante FACS cada siete días de la siguiente manera. En resumen, se extrajeron linfocitos NK totales del pocillo de cultivo tisular. Tras lavar con PBS, se tiñeron las células con TO-PRO3 2  $\mu$ M. Finalmente, se añadieron 10  $\mu$ l de perlas de recuento (Spherotech, n.º de cat. ACBP-50-10) a cada muestra que sirvió como un patrón interno para la calibración del número total de células. Se calculó el número de NK relativo basándose en el número de linfocitos NK vivos totales por 1.000 perlas de recuento extraídas.

Se llevó a cabo el ensayo de citotoxicidad de NK mediante la mezcla de los linfocitos NK con células diana a diferentes proporciones de células efectoras/diana (E/T). Tras el cultivo durante la noche, se determinó el número de células diana usando el método de perlas de recuento descrito anteriormente además de marcadores de la superficie celular para diferenciar los linfocitos NK de las células diana. Para la citotoxicidad de NK de las células K562, se usaron anticuerpos anti-HLA-ABC conjugados con FITC como marcador de linfocitos NK, porque las células K562 son HLA-ABC negativas. Para las células de AMDAC, se usó CD90-PE para distinguir las AMDAC de los linfocitos NK y K562. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como  $(1 - \text{número total de células diana de la})$

muestra / células diana totales de un control que no contenía linfocitos NK) x 100.

### **6.5.2 Sesgo de AMDAC del compartimiento de linfocitos T**

Se examinó la capacidad de las AMDAC para influir en el sesgo en el compartimiento de los linfocitos T midiendo los linfocitos T productores de citocinas en ensayos de sesgo de Th1 y Th17 usando cultivos conjuntos de linfocitos T y AMDAC. En resumen, en el ensayo de sesgo de Th1, se sembraron previamente AMDAC. Al día siguiente, se añadieron  $1 \times 10^6$ /ml de linfocitos T, Dynabeads a  $6 \times 10^5$ /ml, IL-2 (200 UI/ml), IL-12 (2 ng/ml) y anti-IL-4 (0,4 µg/ml), y se mezclaron con las AMDAC. Cuatro días más tarde, se analizó el porcentaje de linfocitos Th1 mediante tinción intracelular de interferón-gamma (IFN-γ). Como se muestra en la Figura 6, las AMDAC redujeron en gran medida el porcentaje de Th1 de una manera dependiente de la dosis. Del mismo modo, en un ensayo de sesgo de Th17, se sembraron previamente AMDAC durante la noche. Entonces, se añadió una mezcla de linfocitos T ( $1 \times 10^6$ /ml), células CD14<sup>+</sup> ( $1 \times 10^6$ /ml), anti-CD3 (50 ng/ml) y lipopolisacárido bacteriano (LPS) (100 ng/ml) a la placa que contenía AMDAC. Tras un cultivo de seis días, se examinó el porcentaje de Th17 mediante tinción intracelular de IL-17. Como se muestra en la Figura 7, las AMDAC suprimieron el porcentaje de Th17 de una manera dependiente de la dosis. Para investigar el efecto de las AMDAC en una población de linfocitos T FoxP3 positiva, se cultivaron conjuntamente  $1 \times 10^6$  PBMC con AMDAC durante 6 días. La población FoxP3 positiva se analizó por tinción intracelular de FoxP3. Como se muestra en la Figura 8, las AMDAC aumentaron ligeramente la población de linfocitos T FoxP3 positiva.

### **6.5.3 Modulación mediada por las AMDAC de la maduración y función de DC**

El presente experimento demuestra que las AMDAC modulan la maduración y la diferenciación de las células dendríticas inmaduras (DC).

Para explorar la modulación mediada por las AMDAC de la maduración y la función de las DC, se trataron DC inmaduras derivadas de monocitos con LPS solo o una combinación de LPS más IFN-γ en ausencia o en presencia de AMDAC para impulsar aún más el proceso de maduración de las DC. La maduración de las DC se analizó por tinción FACS de los marcadores de maduración de DC CD86 y HLA-DR. La función de las DC se evaluó mediante la tinción intracelular de IL-12 y la medición de la producción de citocinas solubles por CBA. Como se muestra en las figuras 9A y 9B, las AMDAC suprimieron fuertemente la maduración de las DC inducida por LPS y LPS más IFN-γ mediante la modulación por disminución de la expresión de CD86 (Figura 9A) y de HLA-DR (Figura 9B) en las DC. Además, como se muestra en la Figura 9C, las AMDAC suprimieron significativamente la población de DC productora de IL-12 estimulada por LPS más IFN-γ en un ~70 %. Además, las AMDAC resultaron ser capaces de inhibir la producción de TNF-α e IL-12 por las DC estimuladas con LPS. Vea la Figura 10.

### **6.5.4 Las AMDAC inhiben la producción de IL-21 en un cultivo de sesgo de Th17**

La IL-21 es una citocina importante necesaria para el mantenimiento de una población de Th17. Para investigar si las AMDAC son capaces de modular la producción de IL-21, se introdujeron AMDAC en un cultivo de sesgo de Th17 según lo descrito en el apartado de Métodos. Las AMDAC suprimieron la producción de IL-21 en 72,35 % en los cultivos conjuntos de AMDAC-Th17 en comparación con un cultivo de sesgo de Th17 sin células AMDAC. Además, las AMDAC redujeron la población de los linfocitos T Th17 en 72,65 % en comparación con el cultivo en ausencia de las AMDAC.

### **6.5.5 Modulación por parte de las AMDAC de la citotoxicidad y la proliferación de los linfocitos NK**

Los linfocitos NK son un tipo de linfocito citotóxico que son un componente importante del sistema inmunitario innato. Los linfocitos NK desempeñan un papel importante en el rechazo de tumores y células infectadas por virus, así como células alogénicas y tejidos. Para investigar el efecto inmunomodulador de las AMDAC sobre los linfocitos NK, se establecieron ensayos de proliferación y citotoxicidad de los linfocitos NK. Como se muestra en la Figura 11, las AMDAC suprimieron la proliferación de los linfocitos NK humanos en comparación con un control carente de células AMDAC.

Además, se investigó el efecto de las AMDAC en la citotoxicidad de los linfocitos NK. En este ensayo, se introdujeron AMDAC en un ensayo de citotoxicidad de NK según lo descrito en el apartado de Métodos anterior. En resumen, se mezclaron  $1 \times 10^6$  linfocitos NK con  $1 \times 10^5$  células K562 (proporción de E/T de 10:1) con una titulación del doble de AMDAC previamente sembradas ( $1 \times 10^5$  células). Se cultivaron conjuntamente los linfocitos NK y las células K562 durante una noche, y se determinó la citotoxicidad de los linfocitos NK de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado de Métodos anterior. Como se muestra en la Figura 12, las células AMDAC suprimieron la citotoxicidad de los linfocitos NK humanos de una manera dependiente de la dosis.

## **6.6 EJEMPLO 6: MÉTODOS DE TRATAMIENTO USANDO CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIO**

### **6.6.1 Tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria usando AMDAC**

Se presenta un individuo con calambres abdominales y diarrea con sangre. Los síntomas han empeorado gradualmente, de forma intermitente, a lo largo del año pasado. Tras excluir el cáncer de colon, se le diagnostica

colitis ulcerosa. Se administran al individuo  $1-5 \times 10^8$  células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) OCT-4<sup>-</sup> en una solución de NaCl a 0,9 % por vía intravenosa. El individuo se controla durante las dos siguientes semanas para evaluar la reducción de uno o más de los síntomas, por ejemplo, la reducción de la cantidad de sangre en las heces. El individuo se controla, además, en el transcurso del año siguiente, y se administran AMDAC a la misma dosis según sea necesario, por ejemplo, si los síntomas reaparecen.

#### 6.6.2 Tratamiento de la enfermedad de Crohn usando AMDAC

Se presenta un individuo con ileocolitis, una forma de enfermedad de Crohn, que sufre dolor abdominal, diarrea con sangre y fiebre. El individuo recibe  $1-5 \times 10^8$  células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) OCT-4<sup>-</sup> en una solución de NaCl a 0,9 % por vía intravenosa. El individuo se controla durante las dos semanas siguientes para evaluar la reducción de uno o más de los síntomas. El individuo se controla, además, en el transcurso del año siguiente, y se administran AMDAC a la misma dosis según sea necesario, por ejemplo, si los síntomas reaparecen.

#### 6.6.3 Tratamiento de la artritis reumatoide usando AMDAC

Se presenta un individuo con artritis reumatoide en tres o más articulaciones. El individuo recibe una combinación de AMDAC OCT-4<sup>-</sup> y AMDAC OCT-4<sup>-</sup> que se han modificado para producir un polipéptido de fusión que comprende IL-1Ra y DHFR, en la que los dos tipos de células madre se administran en una proporción de 1:1. Las células modificadas por ingeniería genética y las no modificadas son  $1-5 \times 10^8$  AMDAC OCT-4<sup>-</sup> en una solución de NaCl a 0,9 %. El individuo recibe metotrexato a una dosis convencional y se controla para determinar la reducción de la inflamación articular. El individuo se controla, además, en el transcurso del año siguiente, y se administran AMDAC a la misma dosis según sea necesario, por ejemplo, si los síntomas reaparecen.

#### 6.6.4 Tratamiento de la diabetes usando AMDAC

Se presenta un individuo con visión borrosa, micción frecuente, aumento de la sed y aumento del hambre que se han desarrollado durante los dos meses anteriores. Los análisis de sangre confirman niveles elevados de glucosa en sangre (superiores a 7,0 mmol/l de glucosa o superiores a 126 mg/dl de glucosa). Se le diagnostica diabetes mellitus de tipo 1. El individuo recibe células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) OCT-4<sup>-</sup> en una solución de NaCl a 0,9 % por vía intravenosa, y se controla la glucosa en sangre del individuo durante los seis meses siguientes. La administración se considera exitosa si los niveles de glucosa en sangre del individuo caen a menos de 7,0 mmol/l de glucosa o menos de 126 mg/dl de glucosa. La administración se repite si, en el seguimiento posterior, se vuelven a encontrar niveles de glucosa en sangre en el individuo que superan los 7,0 mmol/l de glucosa o los 126 mg/dl de glucosa.

#### 6.6.5 Tratamiento de combinación de la enfermedad de injerto contra hospedador usando AMDAC

Se administran a un individuo en espera de un trasplante alogénico de médula ósea células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) OCT-4<sup>-</sup> en una solución de NaCl a 0,9 % por vía intravenosa en las 24 horas previas al trasplante de médula ósea. Se repite la administración de las células madre en las 24 horas posteriores al trasplante de médula ósea. El individuo se controla en los 100 días siguientes, y recibe una dosis de seguimiento de  $5-10 \times 10^8$  AMDAC OCT-4<sup>-</sup> si la GVHD se desarrolla y progresa más allá de Grado I.

### 6.7 EJEMPLO 7: USO DE AMDAC PARA EL TRATAMIENTO DE ADULTOS CON ENFERMEDAD DE CROHN DE MODERADA A GRAVE

Se administran a doce pacientes con enfermedad de Crohn activa de moderada a grave que no han respondido a al menos 1 tratamiento previo 2 infusiones de AMDAC OCT4<sup>-</sup> con una semana de diferencia. Los pacientes son controlados entonces cada semana durante 4 semanas más, volviéndose a evaluar a los 6 meses después de la infusión. Los 6 primeros pacientes reciben 2 infusiones de  $2 \times 10^8$  células (dosis baja) y los otros 6 reciben 2 infusiones de  $8 \times 10^8$  células (dosis alta). A lo largo del estudio, se mantienen medicaciones concomitantes. La actividad de la enfermedad se mide usando el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CAI). Los sujetos también completan el cuestionario de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBDQ). La edad media de los pacientes es de 35-40 años. Todos los pacientes se controlan para determinar la mejora en la enfermedad de Crohn según el CAI existente al menos para 2 visitas consecutivas, por ejemplo, a las 4 semanas y 6 meses, y para determinar la remisión (CAI < 150) mantenida durante al menos 2 visitas consecutivas.

### 6.8 EJEMPLO 8: EFICACIA DE LAS AMDAC EN UN MODELO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

El presente ejemplo demuestra la capacidad de las AMDAC OCT-4<sup>-</sup> y CD49f<sup>+</sup> para mejorar los tiempos de supervivencia y reducir los síntomas, en un modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE) de ratón de esclerosis múltiple crónica. Los síntomas de la EAE se indujeron mediante una combinación de glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG33-55) en emulsión de adyuvante de Freund completo (CFA), y toxina toserfínica (PTX).

Se separaron ratones hembra C57BL/6 experimentales (Taconic), de 30 días de vida, en cuatro grupos: (1)  $1,5 \times 10^6$  células de una población de AMDAC OCT4<sup>-</sup> y CD49f<sup>+</sup>; (2) control de vehículo; (3) grupo de control de la enfermedad



5 (CFA/PTx, sin tratamiento con MOG35-55); y (4) ratones no tratados que recibieron MOG35-55/CFA/PTx, pero no AMDAC. Los Grupos 1-3 y 5 consistían en 10 ratones cada uno, y el Grupo 4 consistía en 5 ratones. Cada ratón de los Grupos 1-4 recibió 400 microlitros de MOG35-55/CFA/PTx y AMDAC, vehículo, CFA/PTx o MOG35-55/CFA/PTx, respectivamente. Se indujeron síntomas de la esclerosis múltiple en los ratones de los Grupos 1, 2 y 4 mediante la administración de MOG35-55/CFA, en combinación con PTx. Se administró MOG35-55 el día 0 y se administró PTx el día 1, con o sin AMDAC. El Grupo 4 recibió CFA y PTX, pero no recibió MOG35-55. Se tomaron los pesos de los animales cada 2-3 días tras la administración, y se evaluó el desarrollo de los síntomas durante los 32 días siguientes a la administración cada día después de la administración usando la siguiente escala:

0	Sin cambios evidentes en las funciones motoras del ratón en comparación con los ratones no inmunizados. Cuando se le coge por la cola, la cola se tensa y está erecta. Las patas traseras normalmente se separan. Cuando el ratón camina, camina derecho y no inclina la cabeza.
1	La cola está flácida. En lugar de estar erecta, la cola cae sobre los dedos.
2	Cola flácida junto con debilidad las patas traseras. Cuando se coge por la cola, las patas traseras del ratón no se separan. El ratón camina de manera claramente inestable.
3	El ratón presenta la cola flácida y una parálisis total de las patas traseras o el ratón presenta la cola flácida y al menos una pata delantera paralizada o el ratón muestra inclinación de la cabeza, camina por la periferia de la jaula, empuja la pared de la jaula y gira cuando se le coge por la cola.
4	Cola flácida más parálisis total de las patas traseras y parcial de las patas delanteras, aunque el ratón se mantiene alerta y se alimenta.

10 Las puntuaciones recibieron la mitad del valor a discreción de los experimentadores. El inicio de los síntomas, por lo general, se produjo el día 10 o en torno al día 10.

15 Las puntuaciones clínicas de los ratones que recibieron AMDAC (G9) mostraron una mejora clara frente a los ratones que recibieron vehículo (G1) los Días 12-24 (Figura 13 A), y el peso corporal de los ratones que recibieron AMDAC fue notablemente superior al de los ratones que recibieron vehículo en los Días 12-28 (Figura 13B). Por otra parte, los ratones que recibieron AMDAC desarrollaron síntomas a una mediana del día después de la administración significativamente posterior en comparación con los ratones que solo recibieron vehículo ( $p = 0,0275$ ; Figura 14). Como era de esperar, los ratones que no recibieron tratamiento desarrollaron síntomas, y los ratones que no recibieron MOG33-55 no desarrollaron síntomas significativos en el transcurso del experimento.

20 Por lo tanto, la administración de las AMDAC no solo mejoró el grado de los síntomas y la pérdida de peso corporal observados en los ratones sintomáticos, sino que retrasó el inicio de los síntomas, lo que indica que las AMDAC tienen beneficio terapéutico en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

## REIVINDICACIONES

1. Células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene o está en riesgo de desarrollar asma, la enfermedad del injerto contra hospedador, enfermedad intestinal inflamatoria, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis, lupus eritematoso, diabetes, micosis fungoide o esclerodermia, en el que el método comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de dichas células adherentes derivadas del amnios (AMDAC), en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para producir una mejora detectable en uno o más síntomas de dicho asma, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis, lupus eritematoso, diabetes, micosis fungoide o esclerodermia, y en el que dichas AMDAC son OCT-4<sup>-</sup>, según lo determinado por RT-PCR y CD200<sup>+</sup> según lo determinado por citometría de flujo y adherentes al plástico de cultivo tisular.
2. Las AMDAC para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o dicho trastorno está causado por o mediado por una respuesta proinflamatoria de Th1 o Th17, y en el que dicha administración comprende poner en contacto linfocitos T que median dicha respuesta de Th1 o Th17 con dichas AMDAC.
3. Las AMDAC para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que dichas AMDAC:
- (i) reducen la maduración de los linfocitos Th1 en dicho individuo;
  - (ii) regulan positivamente un fenotipo regulador de los linfocitos T en dicho individuo;
  - (iii) reducen la expresión en las células dendríticas (DC) y/o los macrófagos de biomoléculas que potencian una respuesta de Th1 y/o Th17 en dicho individuo; o
  - (iv) reducen de manera detectable la producción de uno o más de linfotóxina-1 $\alpha$  (LT-1 $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y/o interferón gamma (IFN $\gamma$ ) por dichos linfocitos T.
4. Las AMDAC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el método comprende además la administración de un segundo tipo de células madre a dicho individuo, en el que dicho segundo tipo de células madre son células madre embrionarias, células madre aisladas de la sangre periférica, células madre aisladas de la sangre de la placenta, células madre aisladas de perfusión placentaria, células madre no AMDAC aisladas de tejido placentario, células madre aisladas de la sangre del cordón umbilical, células madre del cordón umbilical, células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, células madre derivadas del tejido adiposo, células madre hematopoyéticas o células madre somáticas.
5. Las AMDAC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha enfermedad intestinal inflamatoria es:
- (i) la enfermedad de Crohn, preferentemente, enfermedad gastroduodenal de Crohn, yeyunoileítis, ileocolitis o colitis de Crohn; o
  - (ii) colitis ulcerosa, preferentemente, pancolitis, colitis limitada, colitis distal o proctitis.
6. Las AMDAC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha esclerodermia es esclerodermia difusa, esclerodermia limitada (síndrome de CREST), morfea o esclerodermia lineal.
7. Las AMDAC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha micosis fungoide se encuentra en la fase de parche, en fase de tumor de la piel, en fase de enrojecimiento de la piel (eritrodermia) o en fase de ganglios linfáticos.
8. Las AMDAC para el uso de la reivindicación 1 o 5, en el que dicho síntoma de la enfermedad intestinal inflamatoria es uno o más de inflamación e hinchazón de una parte del tracto GI, dolor abdominal, vaciado frecuente del intestino, diarrea, sangrado rectal, anemia, pérdida de peso, artritis, problemas de la piel, fiebre, engrosamiento de la pared intestinal, formación de tejido cicatricial en el intestino del individuo, formación de llagas o úlceras en el intestino del individuo, desarrollo de una o más fístulas en la pared intestinal del individuo, desarrollo de una o más fisuras en el ano del individuo, desarrollo de deficiencias nutricionales (por ejemplo, deficiencias en una o más de proteínas, calorías, vitaminas), desarrollo de cálculos renales, desarrollo de cálculos biliares, dolor abdominal, diarrea con sangre, náuseas, calambres abdominales, fatiga, pérdida de apetito, pérdida de fluidos corporales y nutrientes, lesiones en la piel, dolor en las articulaciones, deficiencias de crecimiento, osteoporosis, inflamación ocular o enfermedad hepática.
9. Las AMDAC para el uso de la reivindicación 1 o 6, en el que dicho síntoma de la esclerodermia es uno o más de endurecimiento de la piel del rostro, endurecimiento de la piel de los dedos, el síndrome de Reynaud, vasoconstricción inapropiada en una extremidad, calcinosis, telangiectasia o alteración de la motilidad esofágica.
10. Las AMDAC para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho síntoma de la soriasis es artritis soriásica; o uno o más de descamación de la piel, enrojecimiento de la piel, engrosamiento de la piel, formación de placas, decoloración de la lámina ungueal, picadura de las uñas, líneas que atraviesan las uñas, engrosamiento de la piel debajo de la uña, onicolisis, desarrollo de pústulas, inflamación de las articulaciones o del tejido conjuntivo,

inflamación de la piel o exfoliación de la piel.

11. Las AMDAC para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho síntoma de la esclerosis múltiple es uno o más de una perturbación sensorial en una extremidad del individuo, disfunción del nervio óptico, disfunción del tracto piramidal, disfunción de la vejiga, disfunción intestinal, disfunción sexual, ataxia o diplopía.

5 12. Las AMDAC para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha artritis reumatoide implica uno o más de pioderma gangrenoso, dermatosis neutrofilica, síndrome de Sweet, infección viral, eritema nudoso, paniculitis lobular, atrofia de la piel digital, eritema palmar, adelgazamiento difuso (piel de papel de arroz), fragilidad de la piel, nódulos subcutáneos sobre una superficie exterior, por ejemplo, en los codos, fibrosis de los pulmones (por ejemplo, como consecuencia del tratamiento con metotrexato), nódulos de Caplan, vasculitis, infartos con pliegue de uñas, neuropatía, nefropatía, amiloidosis, pseudohipertrofia muscular, endocarditis, insuficiencia del ventrículo izquierdo, valulitis, escleromalacia, mononeuritis múltiple o subluxación atlanto-axial.

10

13. Las AMDAC para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho síntoma del lupus eritematoso es uno o más de eritema malar, desarrollo de placas escamosas rojas gruesas en la piel, alopecia, úlceras en la boca, úlceras nasales, úlceras vaginales, lesiones en la piel, dolor en las articulaciones, deficiencia de anemia, deficiencia de hierro, recuentos de plaquetas y de glóbulos blancos inferiores a los normales, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, presencia de anticuerpos anti-cardiolipina en la sangre, pericarditis, miocarditis, endocarditis, inflamación pulmonar, inflamación pleural, pleuritis, derrame pleural, neumonitis lúpica, hipertensión pulmonar, embolia pulmonar, hemorragia pulmonar, hepatitis autoinmune, ictericia, presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) en la sangre, presencia de anticuerpo del músculo liso (SMA) en la sangre, presencia de anticuerpo microsomal renal/hepático (LKM-1) en la sangre, presencia de anticuerpo anti-mitocondrial (AMA) en la sangre, hematuria, proteinuria, nefritis lúpica, insuficiencia renal, desarrollo de glomerulonefritis membranosa con anomalías de "asa de alambre", convulsiones, sicosis, alteraciones del líquido cefalorraquídeo, deficiencia de la fosfatasa CD45 y/o aumento de la expresión del ligando de CD40 en los linfocitos T del individuo, gastroenteritis lúpica, pancreatitis lúpica, cistitis lúpica, enfermedad inmunitaria del oído interno, disfunción parasimpática, vasculitis retinal, vasculitis sistémica, aumento de la expresión de FcεR1γ, niveles de calcio aumentados y sostenidos en los linfocitos T, aumento del trifosfato de inositol en la sangre, reducción de la fosforilación de la proteína quinasa C, reducción de la señalización de la Ras-MAP quinasa o una deficiencia en la actividad de la proteína quinasa A I.

15

20

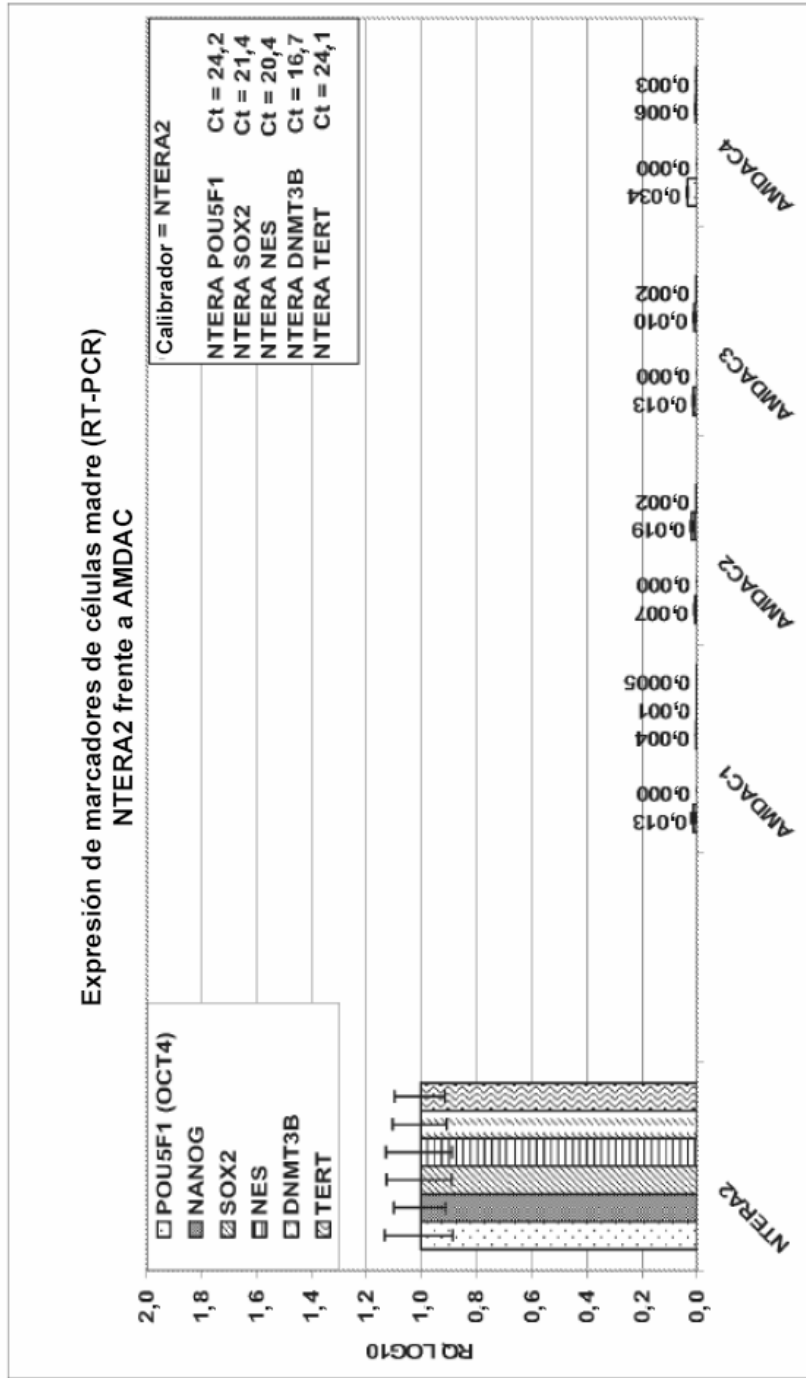
25

14. Las AMDAC para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho síntoma de la diabetes es uno o más de glucemia anormalmente elevada, falta de resistencia a la insulina determinada por un ensayo de tolerancia a la glucosa, fatiga o pérdida de la conciencia.

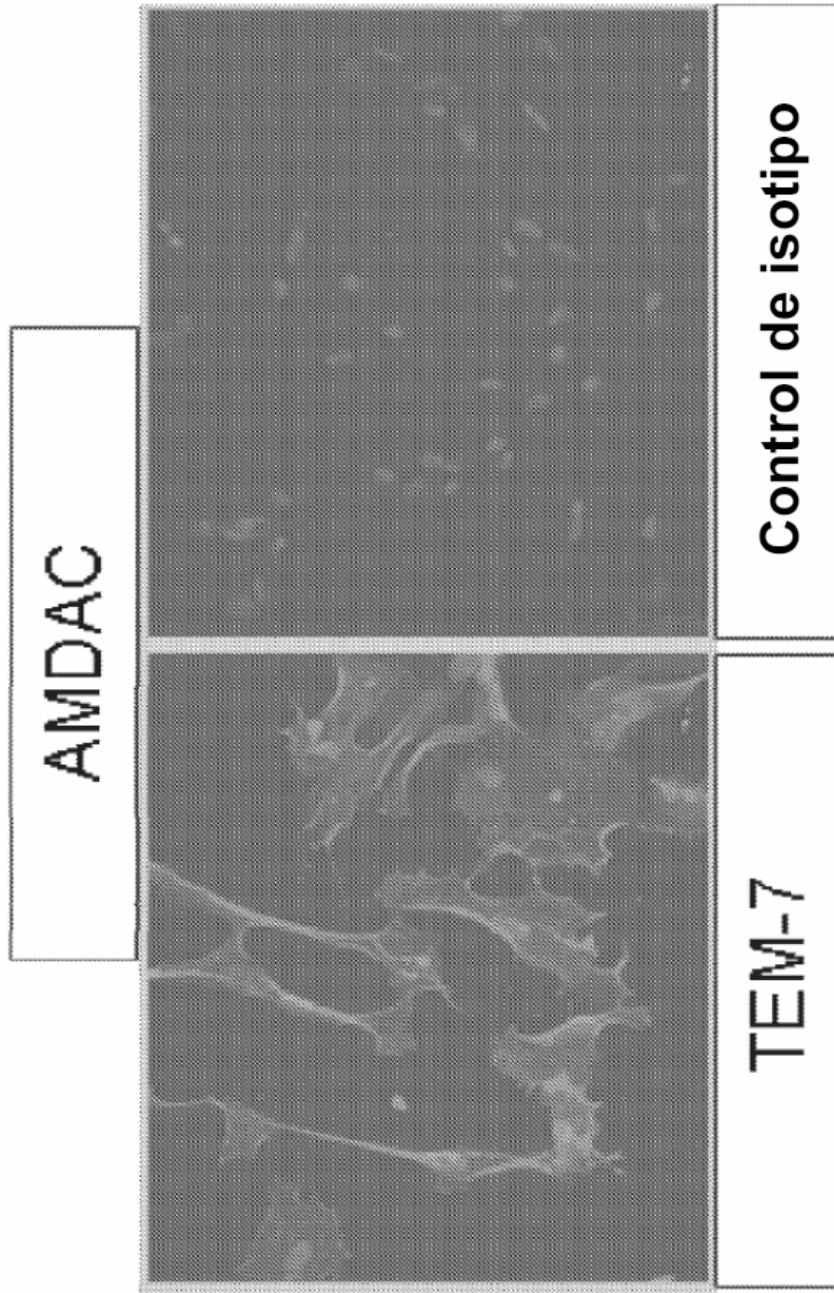
30

15. Las AMDAC para el uso de la reivindicación 1 o 7, en el que dicho síntoma de la micosis fungoide es uno o más de desarrollo de parches planos de color rojo que pican, desarrollo de parches planos de color rojo, que crecen y son duros (placas), desarrollo de erupción cutánea (nódulos), desarrollo de grandes zonas de color rojo escamosas que pican sobre el cuerpo, agrietamiento de la piel de las palmas de las manos y de las plantas de los pies, engrosamiento de la piel de las palmas de las manos y de las plantas de los pies o inflamación de los ganglios linfáticos.

35

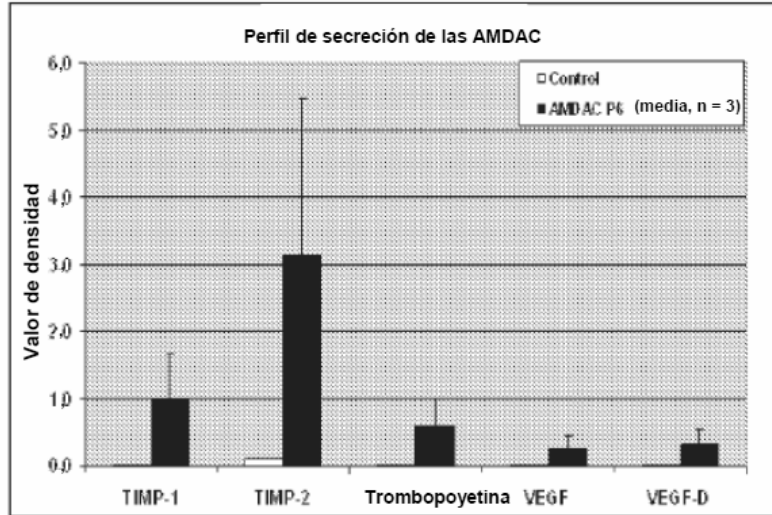


**FIG. 1**

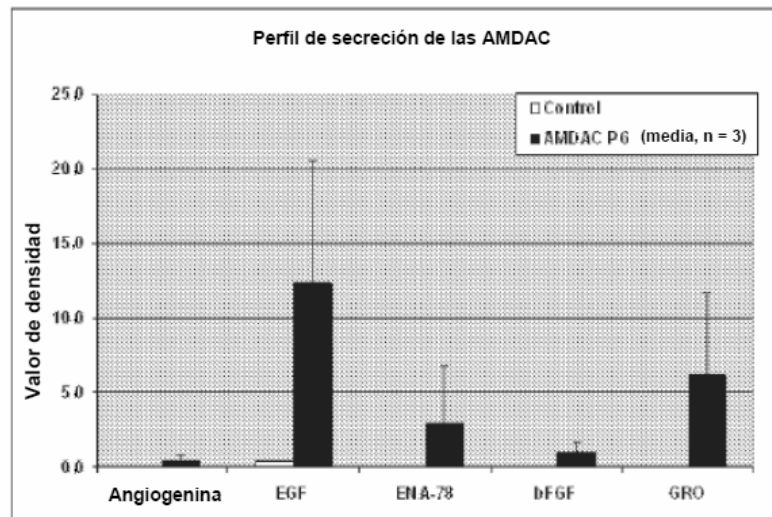


**FIG. 2**

**A**

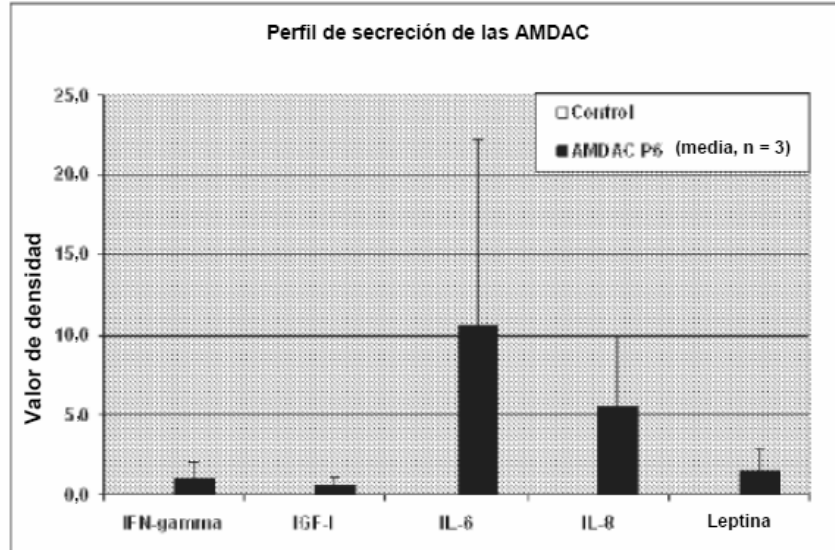


**B**

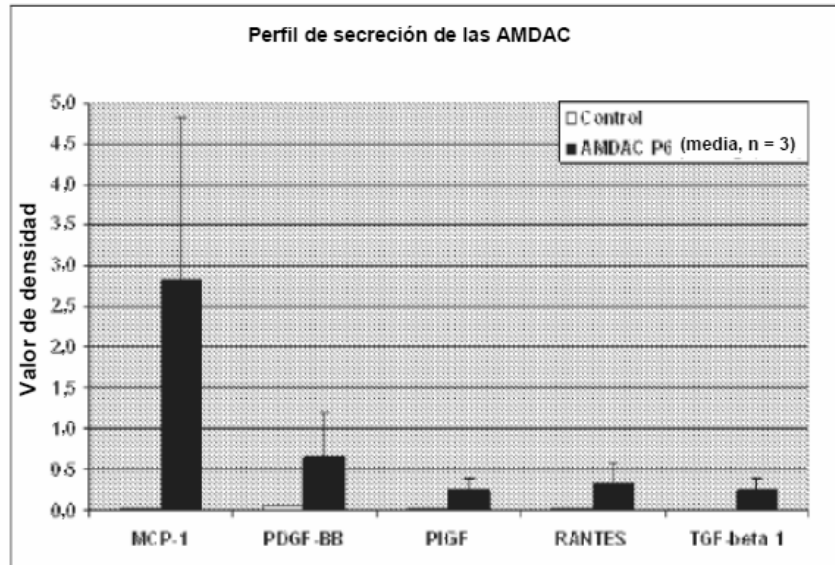


**FIGS. 3A, 3B**

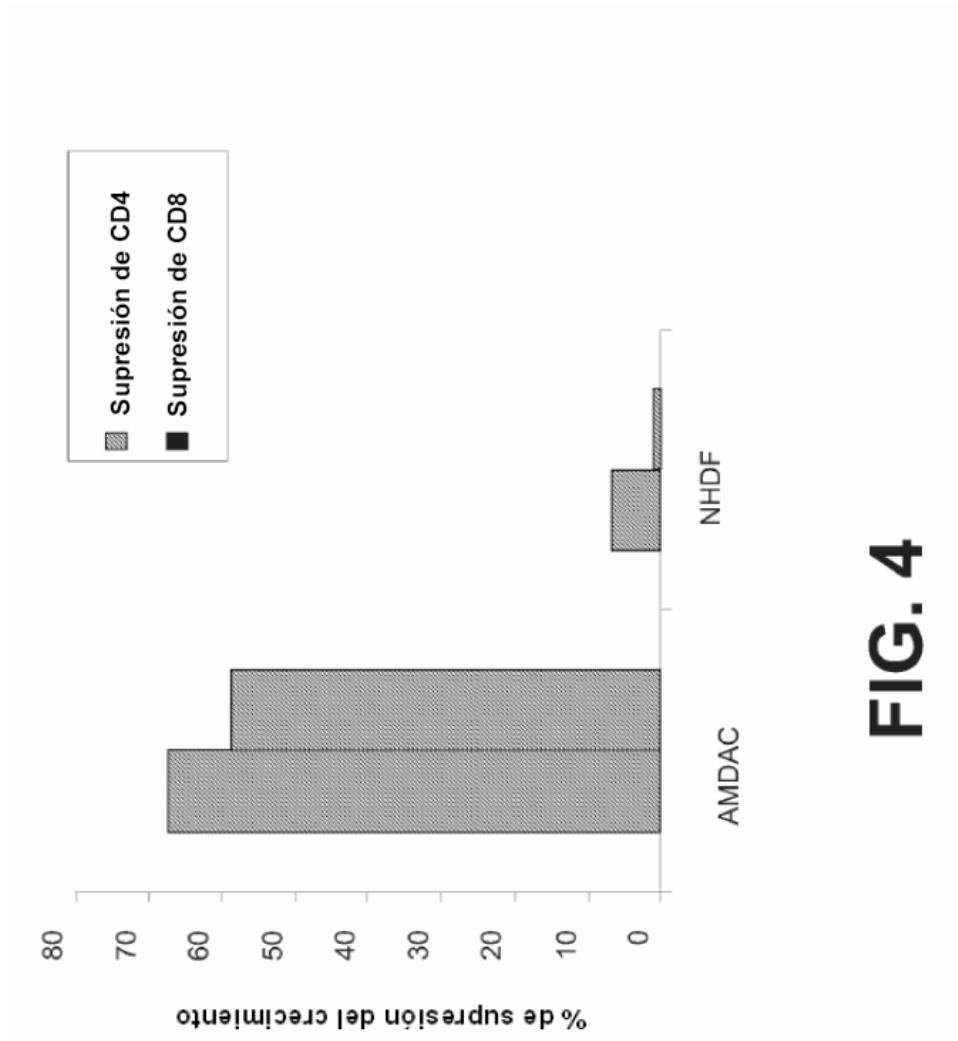
**C**



**D**

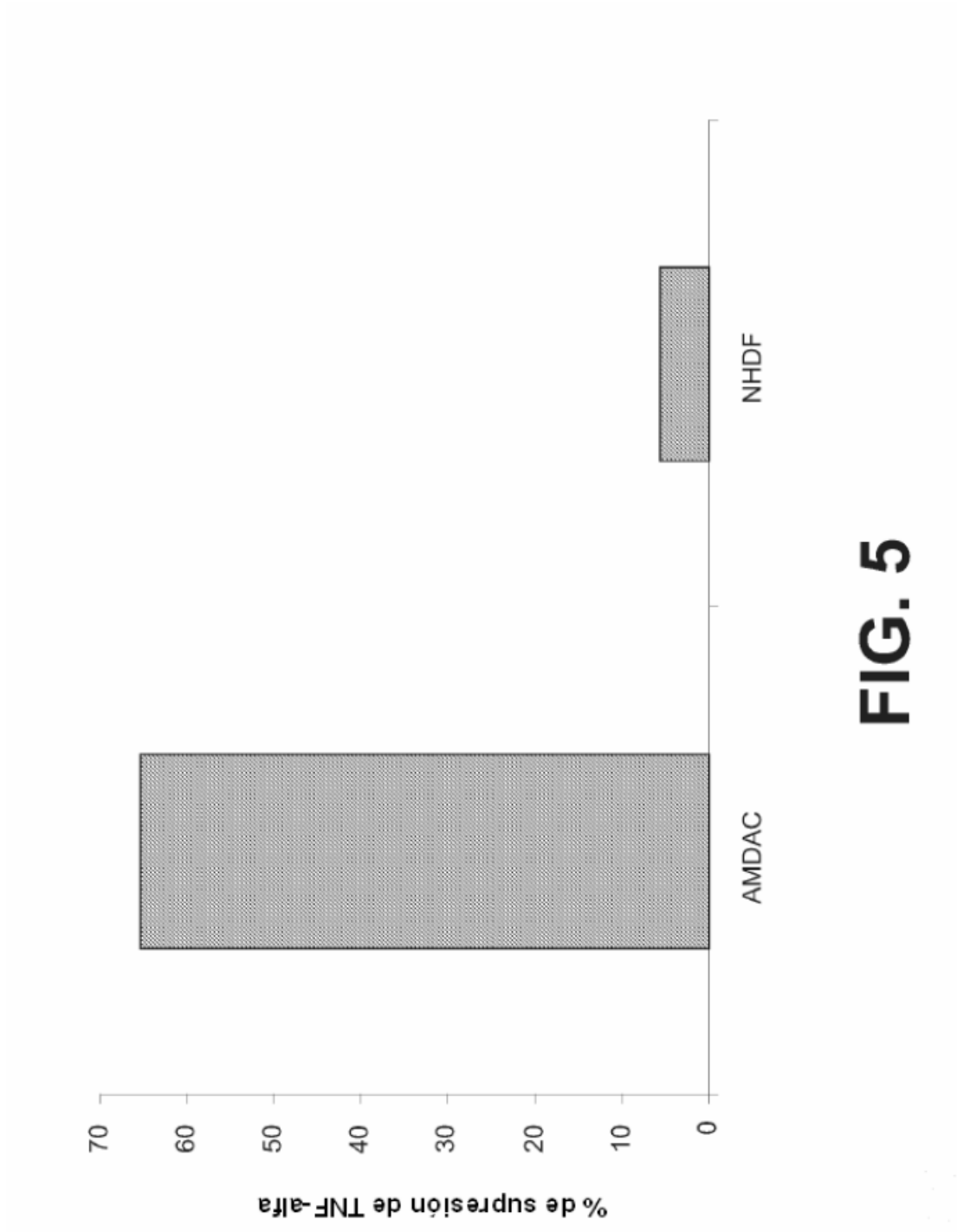


**FIGS. 3C, 3D**

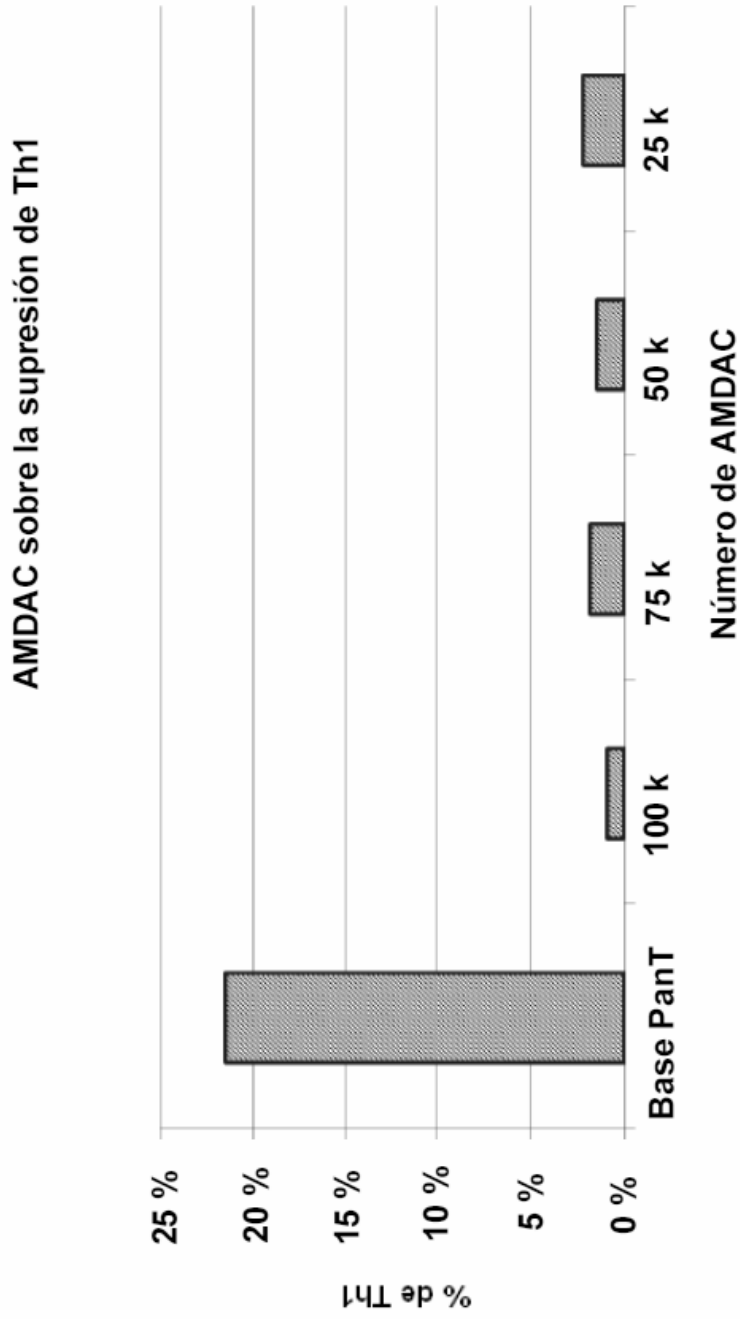


**FIG. 4**

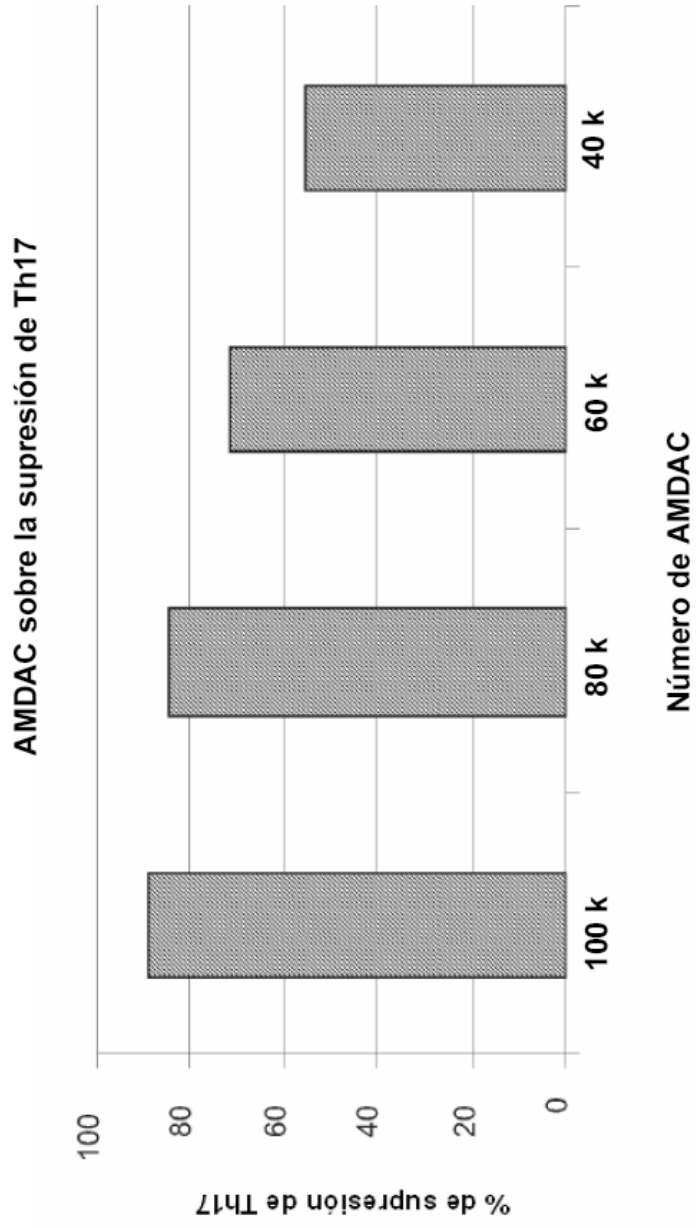




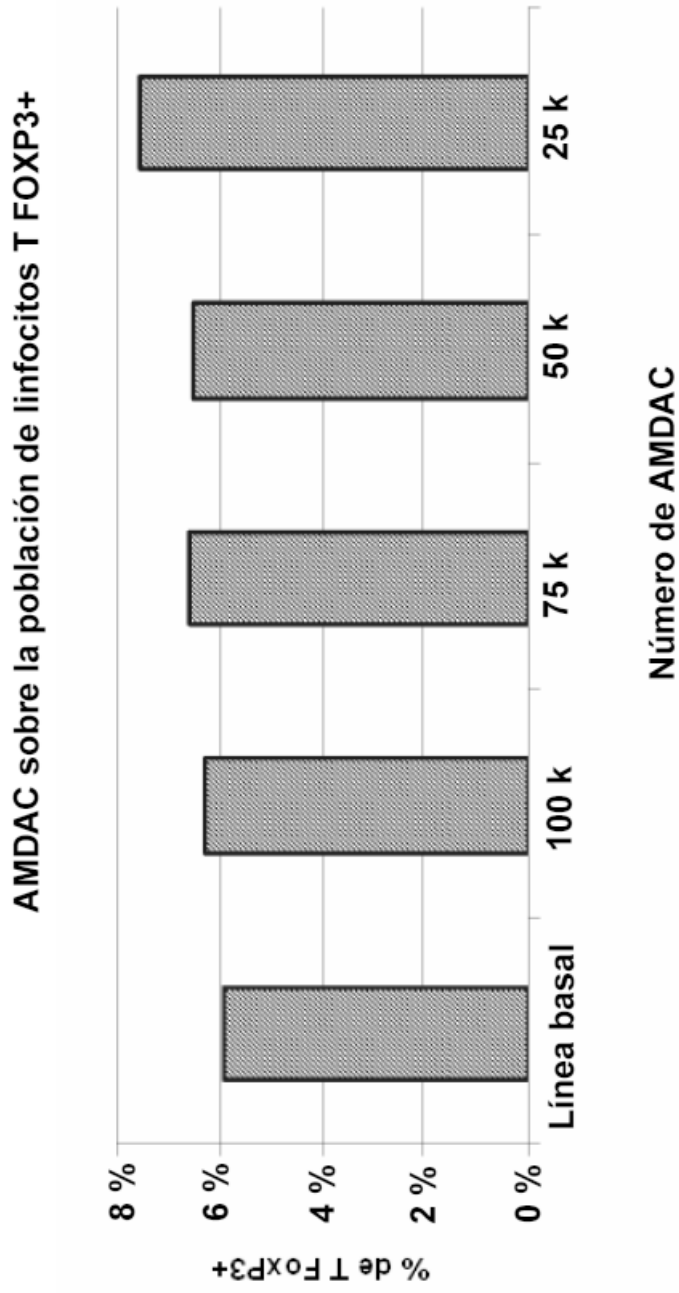
**FIG. 5**



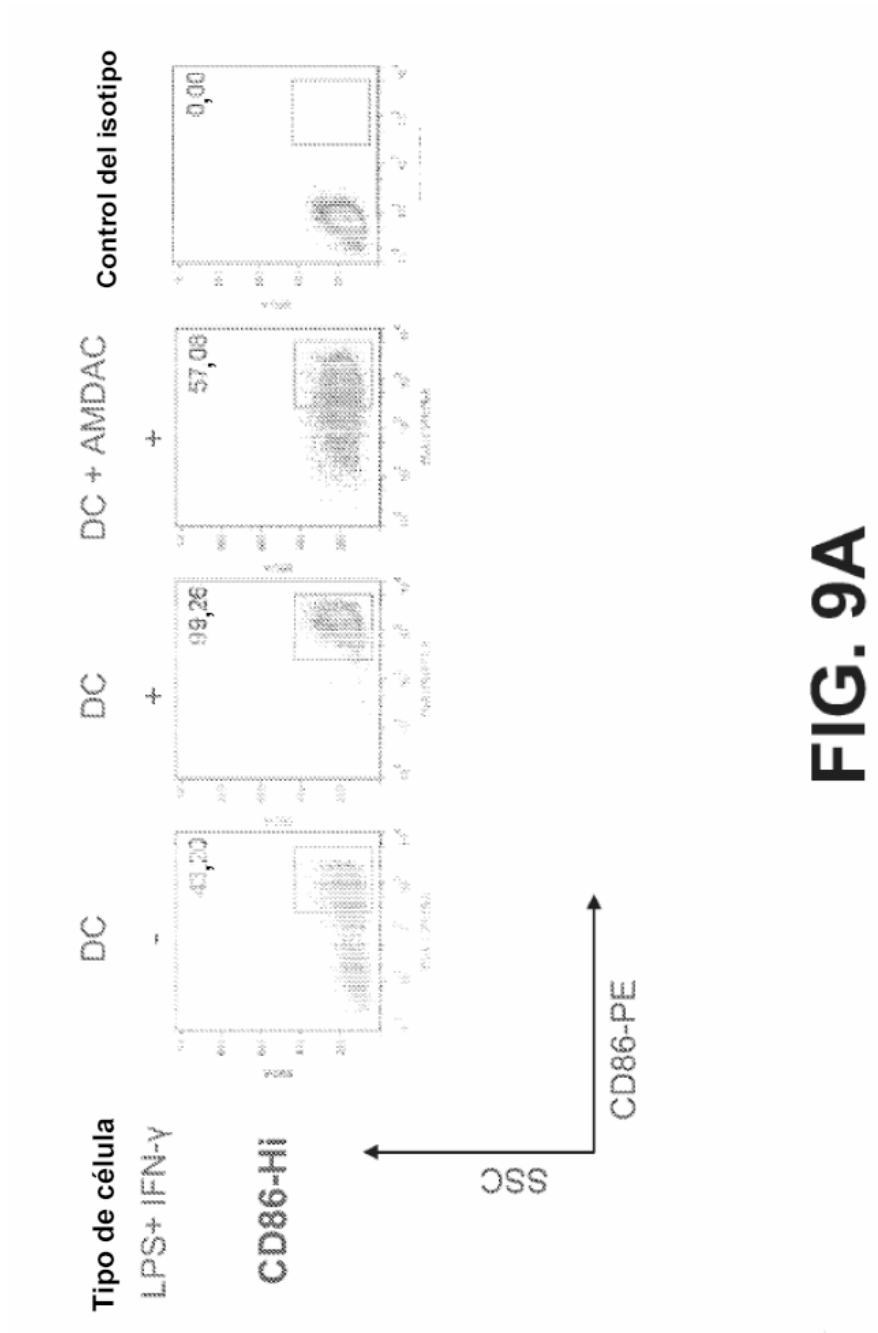
**FIG. 6**



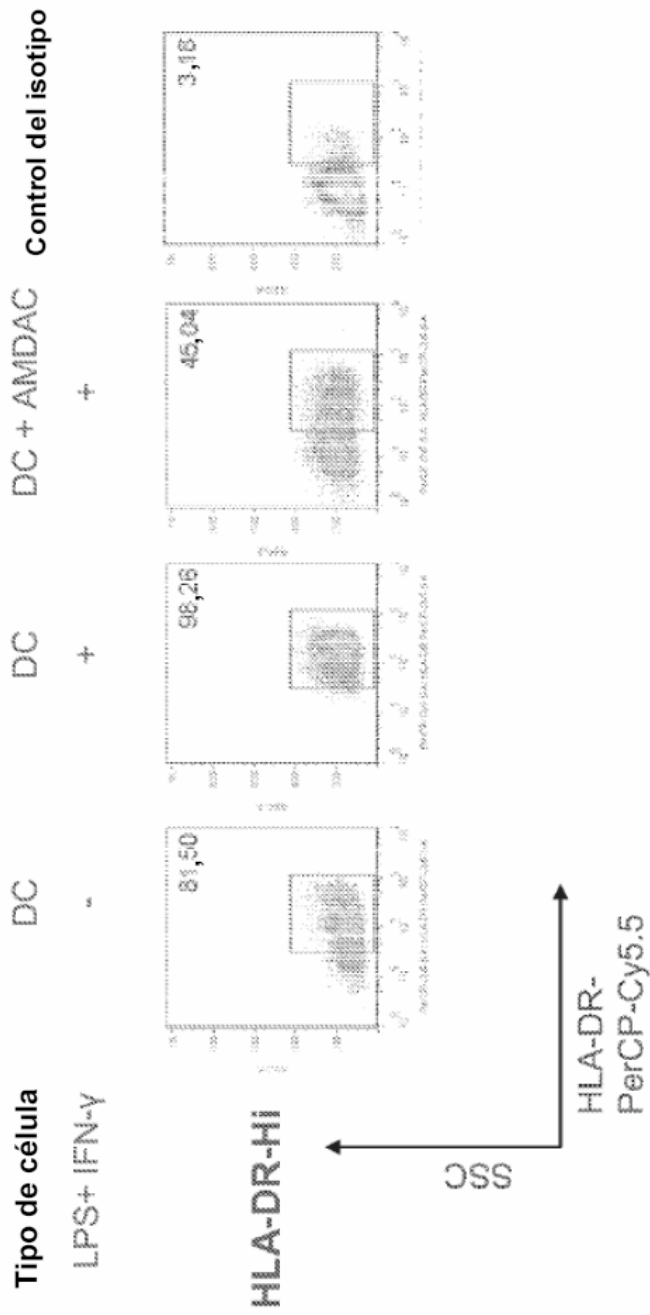
**FIG. 7**



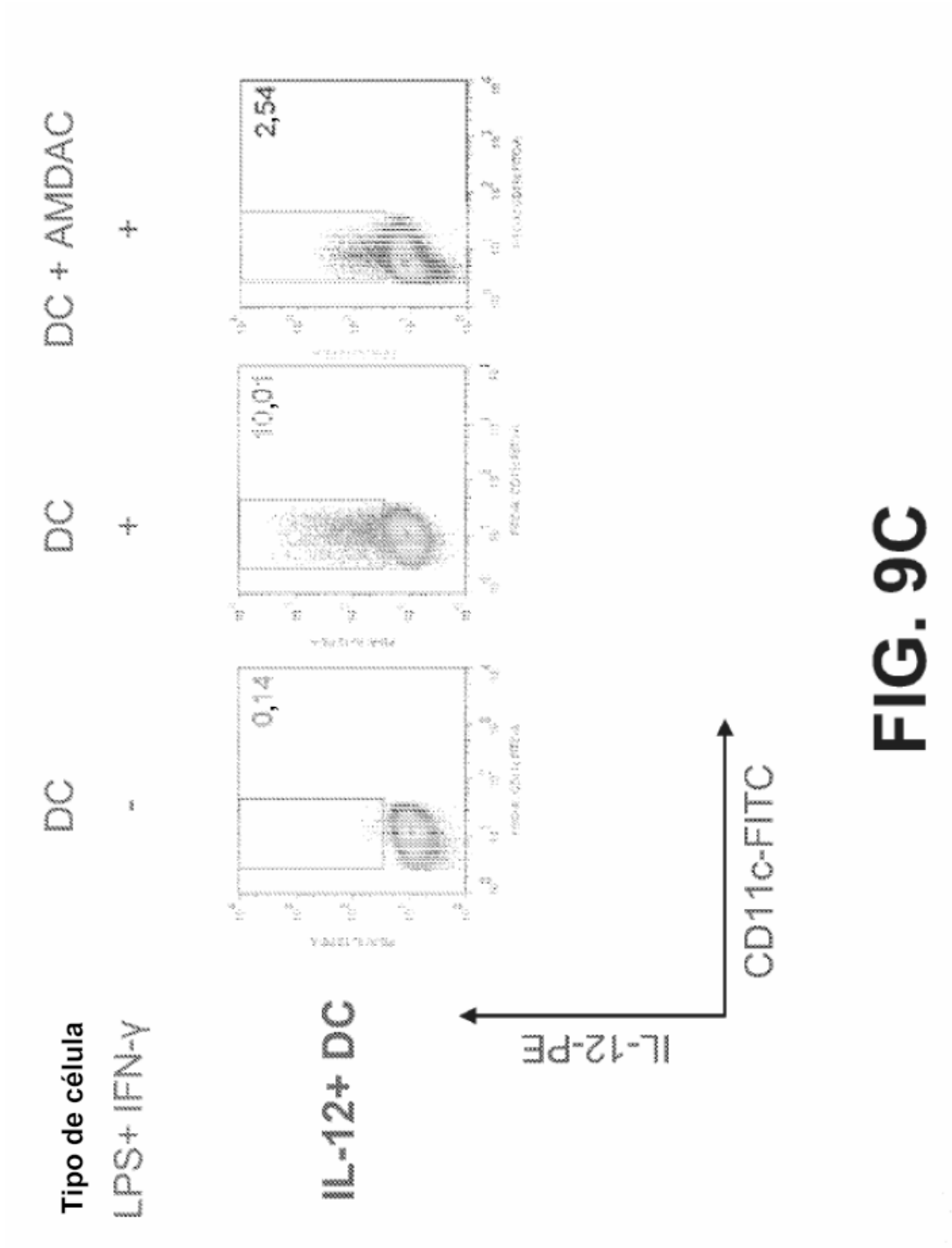
**FIG. 8**



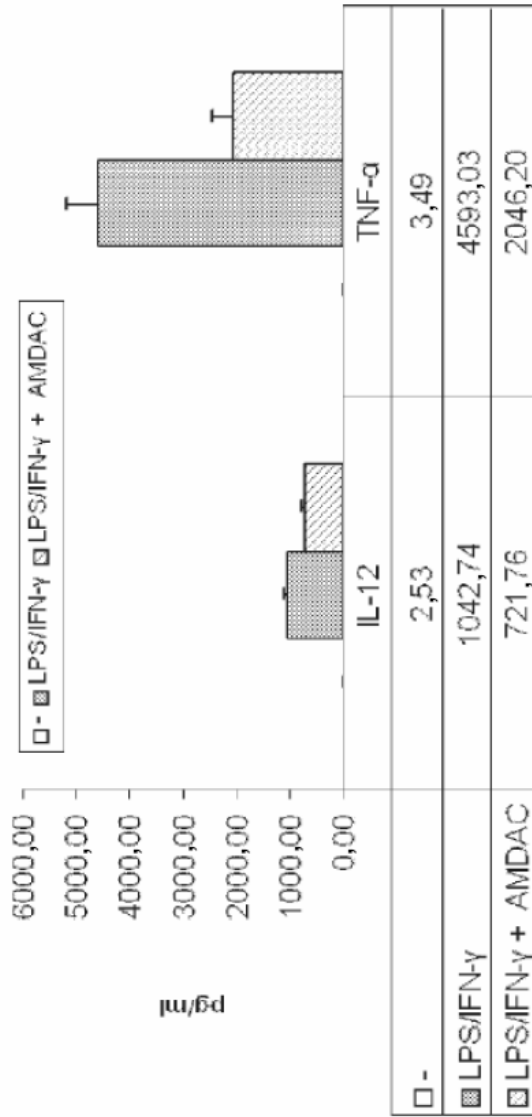
**FIG. 9A**



**FIG. 9B**

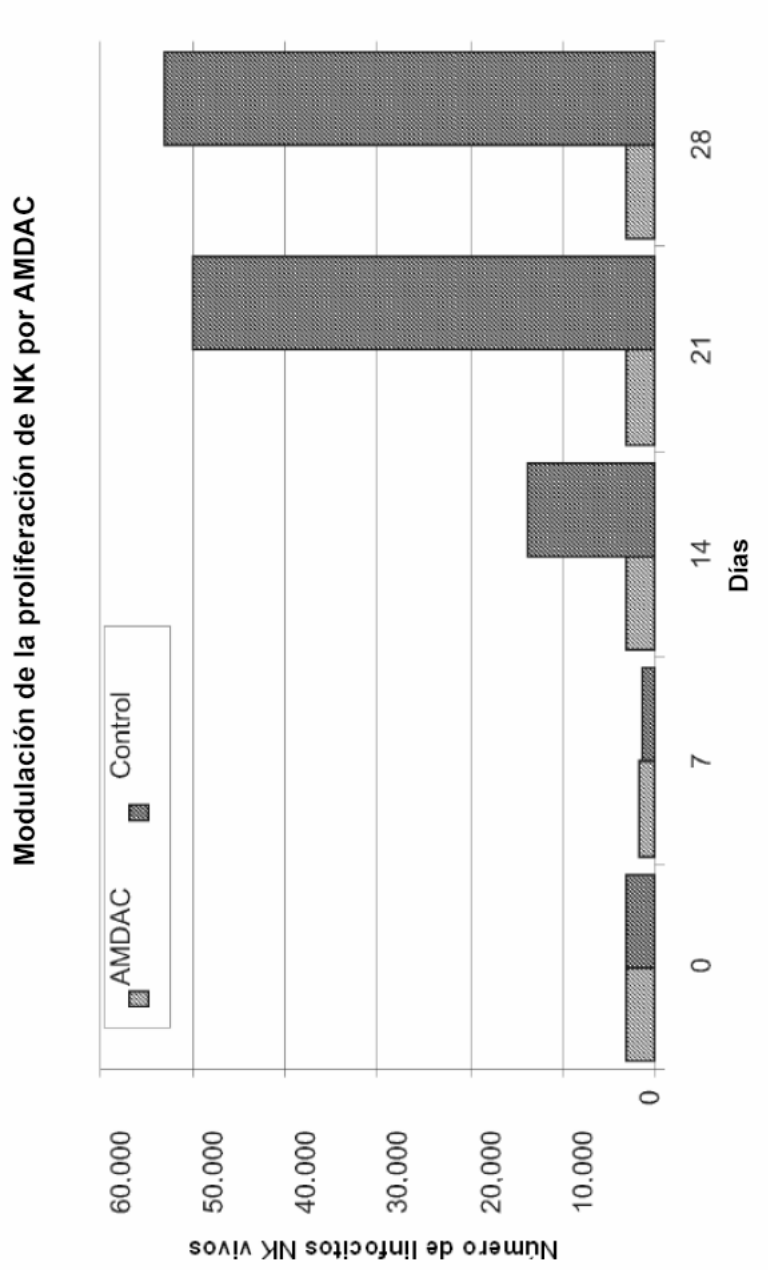


**FIG. 9C**

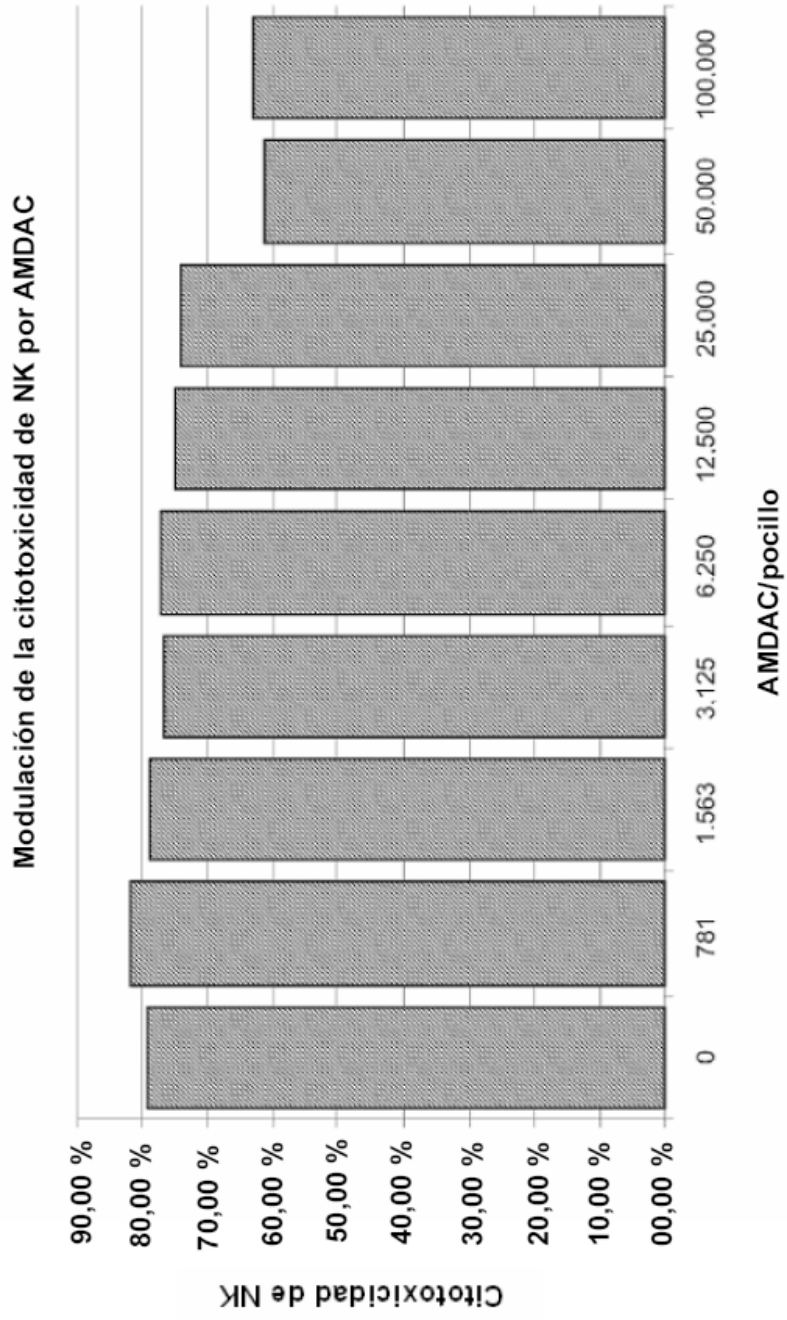


**FIG. 10**



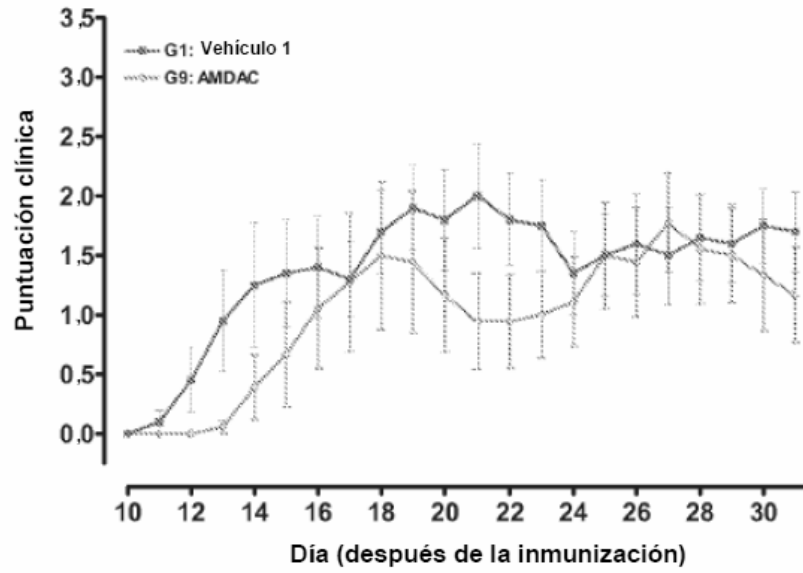


**FIG. 11**

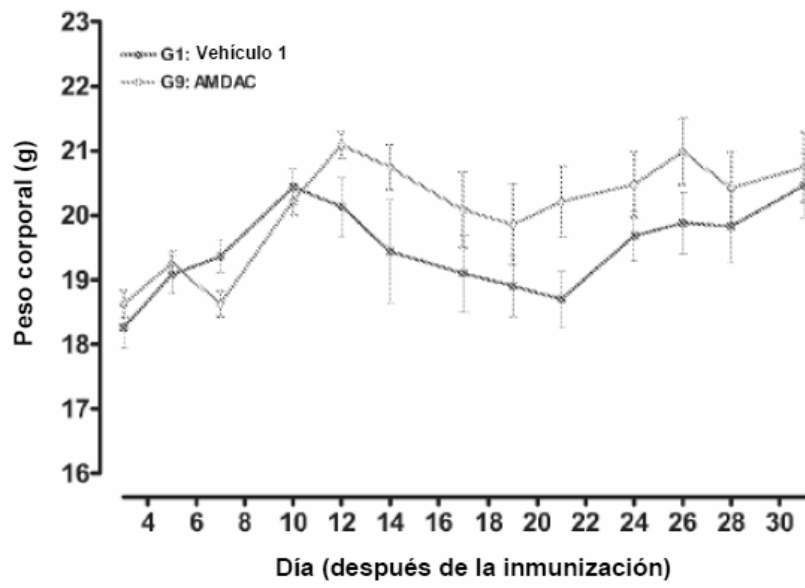


**FIG. 12**

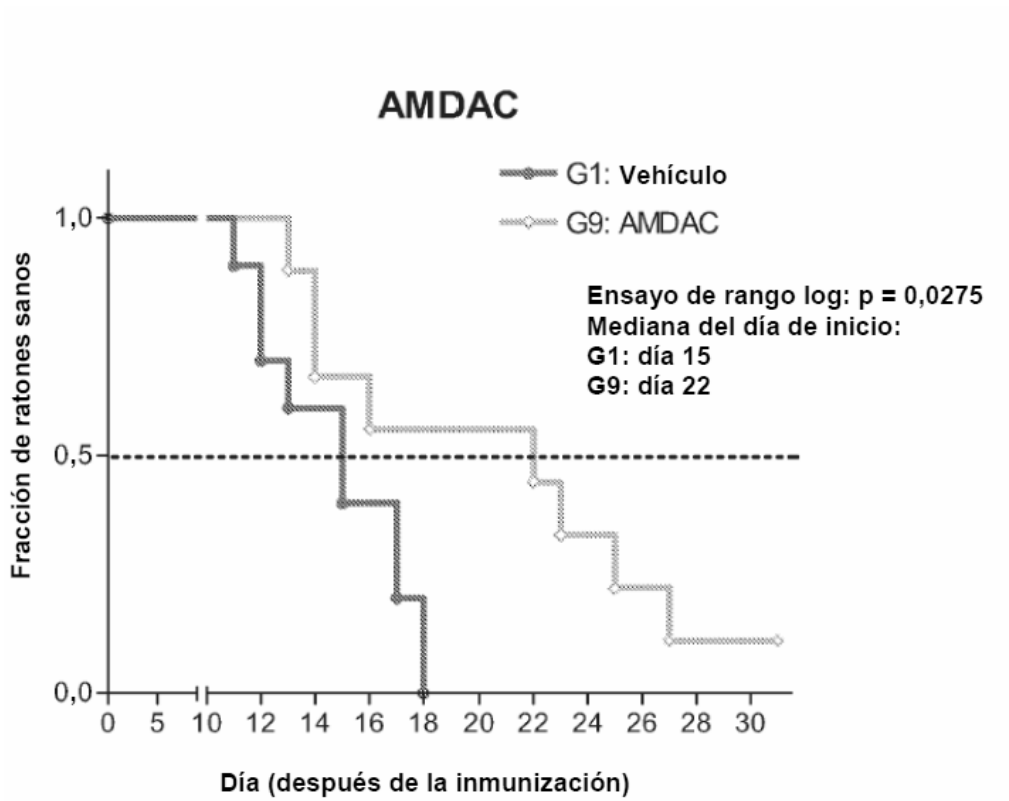
**A**



**B**



**FIGS. 13A, 13B**



**FIG. 14**