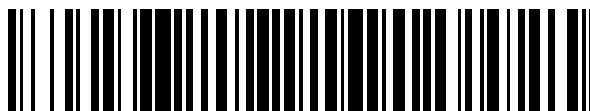


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 141**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/073** (2010.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

**A61K 39/38** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2008 PCT/US2008/000396**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2008 WO08088738**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2008 E 08724478 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2118267**

54 Título: **Nuevos métodos para modular respuestas inflamatorias y/o inmunitarias**

30 Prioridad:

**17.01.2007 US 880745 P**

**21.02.2007 US 902440 P**

**04.10.2007 US 997604 P**

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

**10.07.2017**

73 Titular/es:

**NOVEOME BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
100 Technology Drive, Suite 200  
Pittsburgh, PA 15219, US**

72 Inventor/es:

**MARSHALL, VIVIENNE, S.;**  
**BANAS, RICHARD, A. y**  
**TRUMPOWER, CATHERINE, J.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 623 141 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**

Nuevos métodos para modular respuestas inflamatorias y/o inmunitarias

**5 Declaración con Respecto a la Investigación o Desarrollo Patrocinado Federalmente**

La presente invención se realizó en parte con el apoyo del gobierno de Estados Unidos otorgado por la siguiente agencia: U.S. Army Medical Research Acquisition Activity, ERMS N.º 06100002. Estados Unidos puede tener ciertos derechos con respecto a la presente invención.

10

**Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad bajo 35 USC § 119(e) con respecto a la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 60/880.745, presentada el 17 de enero de 2007, Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 60/902.440, presentada el 21 de febrero de 2007, Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 60/997.604, presentada el 4 de octubre de 2007.

15

**Campo de la invención**

El campo de la invención se refiere a nuevos métodos para modular respuestas inflamatorias y/o inmunitarias. Los métodos de este tipo utilizan composiciones que comprenden células extraembrionarias (denominadas células EE en el presente documento) que incluyen, pero no se limitan a células progenitoras multipotentes derivadas del amnios (denominadas células AMP en el presente documento); solas o en combinación con entre sí y/o en combinación con otros agentes activos adecuados.

20

**Descripción de la técnica relacionada**

La Solicitud Publicada de Estados Unidos N.º 2006026337 desvela las propiedades inmunomoduladoras de células progenitoras adultas multipotentes, denominadas MAPC, y los usos de las mismas.

30

Ueta, M., *et al.*, (Clin Exp Immunol 2002; 129: 464-470) describen las propiedades inmunosupresoras de la membrana amniótica descelularizada.

35

Klyushnenkova, E., *et al.*, (Journal of Biomedical Science, 2005, 12: 47-57) describen respuestas de linfocitos T con respecto a células madre mesenquimáticas humanas alogénicas, denominadas MSC.

Williams, M. (Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research, 2003, 12: 757-758) discuten la expresión funcional de HLA-G y si se puede explotar para trasplante e injerto de células madre satisfactorios.

40

Götherström, C., *et al.*, (The Hematology Journal, 2005, 90 (8): 1017-1026) desvelan que las células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea de adulto no expresan proteína HLA-G.

45

Chang, L., *et al.*, (Cell Research, 2005, 15 (7): 539-547) desvela que las células madre mesenquimáticas derivadas de placenta humana suprimen la proliferación de linfocitos en sangre de cordón umbilical alogénica.

Mailo, M., *et al.*, (Transplantation, 2004, 78 (10): 1439-1448) desvela el potencial de injerto de células de amnios y corión humanos derivadas de placenta a término.

50

Zhang, Y., *et al.*, (Experimental Hematology, 2004, 32 (7): 657-664) desvela que las que las células progenitoras mesenquimáticas derivadas de placenta humana soportan la expansión del cultivo de células de inicio del cultivo a largo plazo partir de células CD34+ de sangre de cordón umbilical.

Aggarwal, S., *et al.*, (Blood, 2005, 105 (4): 1815-1822) desvela que las que las células madre mesenquimáticas humanas modulan respuestas celulares inmunológicas alogénicas.

55

El documento WO 2007/070870 A1 desvela composiciones y métodos para inhibir respuestas inmunitarias adversas en trasplante con falta de coincidencia de histocompatibilidad.

El documento WO 2007/047468 A2 desvela inmunomodulación usando células madre de placenta.

60

Miki y Strom (Stem Cell Review, 2006, 2 (2): 133-141) desvela células madre pluripotentes/multipotentes derivadas del amnios.

### Antecedentes de la invención

Las células madre tienen el notable potencial de proliferar y diferenciarse en muchos tipos de células diferentes en el cuerpo. Al servir como un sistema de reparación para el cuerpo, teóricamente pueden dividirse sin límite para reponer otras células a lo largo de la vida de una persona. Cuando una célula madre se divide, cada nueva célula tiene el potencial de permanecer como una célula madre o convertirse en otro tipo de célula con una función más especializada, tal como una célula muscular, un glóbulo rojo, o una célula cerebral. Quizás la aplicación potencial más importante de las células madre humanas es la generación de células y tejidos que se podrían usar para terapias basadas en células. Se proporcionan ejemplos de estudios de células madre (Tylki-Szymanska, A., *et al.*, Journal of Inherited Metabolic Disease, 1985. 8 (3): p. 101-4; Yeager, A.M., *et al.*, American Journal of Medical Genetics, 1985. 22 (2): p. 347-55; John, T., 2003. 16 (1): p. 43-65, vi.).

El tejido placentario está abundantemente disponible como una fuente descartada de muchos tipos de células potencialmente útiles, incluyendo un tipo de célula multipotente denominada células derivadas de placenta. Aunque se descarta en el momento del parto como parte de las membranas placentarias, el análisis del linaje muestra que, la capa epitelial del amnios, a partir de la que se pueden aislar estas células multipotentes, desciende únicamente del epiblasto en el desarrollo embrionario. El epiblasto contiene las células que en última instancia se diferenciarán en el embrión y las células que darán lugar a un tejido extraembrionario, el amnios. Hasta ahora, en la bibliografía solo se han descrito cuatro tipos de células como pluripotentes. Se trata de la masa celular interna (ICM) del embrión de implantación previa, que da lugar al epiblasto, al propio epiblasto, tallo embrionario (ES) y células germinales embrionarias (EG). Por lo tanto, la identificación, purificación y propagación de una población de células multipotentes a partir de tejidos amnióticos descartados proporcionaría una fuente extremadamente valiosa de células madre para terapia celular de reemplazo.

Con un rendimiento medio de más de 200 millones de células por placenta, en esta fuente hay disponibilidad de un gran número de células. Si estas células se convirtieran en células útiles para medicina de trasplante, podrían proporcionar un suministro casi inagotable de material de partida en cualquier parte en el mundo. Ninguna fuente de células madre proporciona una población inicial tan grande de células, y la recolección no requiere un procedimiento invasivo ni destructivo. Además, no existen problemas éticos, religiosos o sociales asociados con estas células ya que el tejido se obtiene a partir de la placenta.

Otra consideración importante en las terapias de trasplante de células madre y órganos es la tolerancia al injerto. En los seres humanos, originalmente se pensó que la expresión del marcador de superficie celular HLA-G estaba limitado a sitios inmunes privilegiados tales como la placenta, así como células relacionadas, incluyendo algunas aisladas del líquido amniótico, macrófagos placentarios y sangre del cordón umbilical, implicando de ese modo su papel en la tolerancia materno-fetal (Urosevic, M. y Dummer, R. (2002) ASHI Quarterly; 3rd Quarter 2002: 106-109). Además, los estudios que implican la aceptación del injerto de corazón han sugerido que la expresión proteica de HLA-G puede mejorar la tolerancia al injerto (Lila, N., *et al.*, (2000) Lancet 355: 2138; Lila, N. *et al.*, (2002) Circulation 105: 1949-1954). La proteína HLA-G no se expresa en la superficie de células madre embrionarias indiferenciadas o diferenciadas (Drukker, M., *et al.*, (2002) PNAS 99 (15): 9864-9869). Por lo tanto, es deseable que las células madre destinadas a terapias basadas en células expresen la proteína HLA-G.

La transferencia de células, tejidos u órganos vivos de un donante a un receptor, con la intención de mantener la integridad funcional del material trasplantado en el receptor define el trasplante. Un objetivo principal en el trasplante de órganos sólidos es el injerto permanente del órgano donante sin una respuesta inmunitaria de rechazo al injerto generada por el receptor, conservando al mismo tiempo la inmunocompetencia del receptor para responder a otros antígenos extraños. Por lo general, con el fin de prevenir las respuestas de rechazo del hospedador, se usan agentes inmunosupresores no específicos tales como ciclosporina, metotrexato, esteroides y FK506. Estos agentes se deben administrar diariamente y si se detiene su administración, por lo general se produce rechazo al injerto. A pesar del uso de agentes inmunosupresores, el rechazo crónico de los injertos sigue siendo una fuente importante de morbilidad y mortalidad en el trasplante de órganos humanos. La mayoría de los trasplantes humanos fallan en 10 años sin aceptación permanente del injerto. Solo un 50 % de los trasplantes de corazón sobreviven 5 años y un 20 % de los trasplantes de riñón sobreviven 10 años (Opelz, *et al.*, Lancet, 1: 1223 (1981); Gjertson, UCLA Tissue Typing Laboratory, p. 225 (1992); Powles Lancet, p. 327 (1980); y Ramsay, New Engl. J. Med., p. 392 (1982)).

Entre las reacciones adversas más destacadas encontradas como resultado de las terapias de trasplante se encuentran: (i) la respuesta del hospedador contra el injerto ("HVG") (rechazo del trasplante por un hospedador inmunocompetente), y (ii) enfermedad de injerto contra hospedador ("GVHD") (que se produce principalmente en un hospedador inmunocomprometido cuando se reconoce como no propio por células inmunocompetentes en el injerto). El rechazo al injerto en un hospedador se puede evitar combinando perfectamente el donante y el tejido hospedador. Sin embargo, los emparejamientos perfectos son prácticamente inexistentes (con la excepción de los gemelos idénticos). Una manera potencial con respecto a esto es el uso de tejido autólogo (singeneico). Desafortunadamente, el tejido hospedador a menudo no es adecuado o no se recogió antes de la necesidad. De hecho, la necesidad de la terapia de trasplante con frecuencia es reemplazar el tejido dañado en el hospedador. Esto significa que el uso de tejido autólogo (singeneico) generalmente no es útil en aplicaciones prácticas.

Otra opción es emparejar un donante y un hospedador alogénicos tan próximos como sea posible usando formación de tipos de sangre y/o tejido. Desafortunadamente, incluso el más cercano de los emparejamientos no previenen el HVG grave, por lo que las terapias de trasplante alogénico requieren inmunosupresión y fármacos inmunosupresores (véase a continuación).

5 Otro enfoque para evitar el HVG y sus complicaciones en terapias de trasplante es desactivar el sistema inmunológico del hospedador receptor. Un inconveniente para tal inmunosupresión es que compromete las defensas inmunitarias del hospedador de un modo tal que el hospedador es fácilmente susceptible a las infecciones, una causa principal de morbilidad y mortalidad entre los pacientes trasplantados. Comprometer el sistema inmunológico del hospedador también causa o exacerba la enfermedad de injerto contra hospedador ("GVHD"). La GVHD se produce cuando el tejido donante contiene células inmunocompetentes que reconocen las proteínas MHC del receptor como no propias. Esto activa los linfocitos T denominados linfocitos TH1 que a su vez secretan citoquinas proinflamatorias, tales como IL-2, interferón gamma y TNF alfa, que desencadenan un ataque inmunológico contra las dianas receptoras incluyendo la piel, tracto GI, hígado y órganos linfoides (Ferrara y Deeg, 1991). En particular, el GVHD es un problema en los trasplantes de médula ósea, en los que se ha mostrado que están mediados principalmente por linfocitos T (Grebe y Streilein, 1976).

20 Se ha desarrollado un número de fármacos inmunosupresores y se usan para prevenir y/o tratar estas disfunciones del sistema inmunológico. Desafortunadamente, ninguno de los fármacos inmunosupresores disponibles en la actualidad son totalmente eficaces y todos ellos tienen inconvenientes graves y efectos secundarios perjudiciales. Se sabe que los glucocorticoides, que se usan principalmente para tratar la inflamación y las enfermedades inflamatorias, son inmunosupresores y se consideran el mejor tratamiento primario para HVG y GVHD. Inhiben la proliferación de linfocitos T y respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T. Los fármacos que actúan sobre las inmunofilinas (es decir ciclosporina, tacrolimus, sirolimus) pueden ser eficaces para reducir las reacciones inmunológicas adversas en los pacientes trasplantados, pero también debilitan el sistema inmunológico de un modo tal que los pacientes se vuelven altamente vulnerables a las infecciones. Los agentes citostáticos (es decir metotrexato, azatiopina, mercaptopurina, y antibióticos citotóxicos) también se usan ampliamente ya sea solos o en combinación con otros fármacos. Causan una diversidad de efectos secundarios, algunos de los cuales pueden ser perjudiciales para el paciente. También se han usado anticuerpos (policlonales y monoclonales tales como anticuerpos anti-receptor de linfocitos T (CD23) y anti-receptor de IL2 (CD25)). También se han usado otros muchos fármacos (es decir interferón, opioides, proteínas de unión al TNF, micofenolato, y agentes biológicos pequeños tales como FTY720). Ninguno de los fármacos inmunosupresores, ya sea usado solo o en combinación con otros agentes, es totalmente eficaz y por lo general todos ellos dejan a los pacientes aún susceptibles a HVG y GVHD y debilitan su capacidad de defenderse contra la infección. Además, todos estos fármacos causan efectos secundarios graves, incluyendo toxicidad gastrointestinal, nefrotoxicidad, hipertensión, mielosupresión, hepatotoxicidad e hipertensión, por nombrar algunos.

40 Claramente, un tipo más específico de supresión inmunológica sin los inconvenientes enumerados anteriormente sería ideal. Por ejemplo, un agente que puede suprimir o eliminar linfocitos T alorreactivos, de forma específica, podría ser eficaz frente a HVG y GVHD (al menos para los injertos alogénicos) sin los efectos secundarios negativos que se producen con agentes que por lo general atacan y comprometen al sistema inmunológico. Sin embargo, hasta la fecha, no se han desarrollado agentes similares. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es satisfacer esta necesidad no satisfecha.

#### 45 **Resumen de la Invención**

De acuerdo con la presente divulgación, los Solicitantes han descubierto que las células extraembrionarias (células EE) que incluyen, pero no se limitan a células positivas para HLA-G extraembrionarias (células EHP) y de las células progenitoras multipotentes derivadas del amnios (células AMP), y/o lisados celulares y/o medios condicionados derivados de las mismas, solas o en combinación entre sí y/u otros agentes activos adecuados, son agentes útiles capaces de suprimir, prevenir, mejorar o tratar HVG, GVHD, así como otros muchos agentes inmunológicos y/o enfermedades y trastornos inflamatorios. Las células de la presente divulgación expresan HLA-G, no expresan antígenos de Clase II de MHC, son negativas con respecto a la telomerasa, no forman teratomas, no son inmortales, segregan factores de modulación celular y están fácilmente disponibles en grandes números.

55 Un objeto de la divulgación es proporcionar métodos para modular las respuestas inflamatorias y/o inmunitarias mediante la administración de células EHP, y en particular, células AMP. También es un objeto de la presente invención suprimir, tratar, prevenir y/o mejorar enfermedades y trastornos inflamatorios, inmunológicos y/o alérgicos en un sujeto con necesidad de los mismos mediante la administración de células AMP. Un objeto adicional de la invención es proporcionar métodos para modular las respuestas inflamatorias y/o inmunitarias y/o tratar, prevenir y/o mejorar enfermedades y trastornos inflamatorios, inmunitarios y/o alérgicos en un sujeto con necesidad de los mismos mediante la administración de medios condicionados derivados de células EHP, lisados celulares derivados de las mismas, o productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, incluyendo en combinación entre sí y/o otros agentes activos adecuados. Un objeto adicional de la invención es proporcionar métodos para modular las respuestas inflamatorias y/o inmunitarias y/o tratar, prevenir y/o mejorar enfermedades y trastornos inflamatorios, inmunitarios, y/o alérgicos en un sujeto con necesidad de los mismos mediante la

administración de medios condicionados derivados de células AMP, que en el presente documento se denominan solución de citoquina derivada del amnios (ACCS), lisados celulares derivados de las mismas, o productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, incluyendo entre sí y/o en combinación con diversas matrices extracelulares y/o dispositivos y/u otros agentes activos adecuados.

5 La caracterización fenotípica de células AMP revela que son candidatos ideales para terapia celular para enfermedades y trastornos mediados por el sistema inmunológico. Como se muestra en el ejemplo que sigue a continuación, los datos *in vitro* muestran que las células AMP no son inmunogénicas y tienen propiedades inmunomoduladoras. Las células AMP regular de manera negativa las respuestas de los linfocitos T a diversos  
10 estímulos, incluyendo las respuestas de mitógeno, alo-antígeno (MLR), y respuestas de linfocitos T de memoria. Los mecanismos mediante los que las células AMP pueden facilitar un entorno inmunomodulador regulado de forma negativa pueden incluir varios aspectos. En primer lugar, las células AMP regulan de forma positiva la expresión de los ligandos de muerte celular programada, PD-L1 y PD-L2, cuando se exponen a citoquinas proinflamatorias tales como IFN- $\gamma$ . Estos ligandos se pueden unir a sus receptores (PD-1) en linfocitos T, dando como resultado  
15 la regulación negativa de la activación y la secreción de citoquinas. Las células AMP también son positivas para la expresión del antígeno Fas. Este antígeno puede interactuar con ligando de Fas expresado en linfocitos T activados e iniciar la muerte celular de estos linfocitos T. Por último, las células AMP tienen alta expresión de antígeno de superficie HLA-G cuando se exponen a IFN- $\gamma$  y citoquinas proinflamatorias. De hecho, las células AMP regulan de forma positiva la expresión de HLA-G en su superficie durante el cultivo en un LMR. Se ha demostrado que HLA-G  
20 tiene funciones inmunomoduladoras sustanciales, incluyendo el deterioro de la proliferación de linfocitos T aloespecíficos, la inhibición de la actividad de los linfocitos NK, tolerancia de células dendríticas e inducción de linfocitos T reguladores. Como se muestra en el ejemplo que sigue a continuación, las células AMP no tienen efectos inmunomoduladores en los linfocitos T cuando se separan de estas células que responden a través de membranas Transwell. Por lo tanto, los mecanismos de acción de las células AMP más probablemente implican el contacto de  
25 célula a célula con células que median al sistema embriológico de respuesta. Estas características únicas de las células AMP las identifican como una terapia celular ideal para afecciones que implican mecanismos mediados por el sistema inmunológico.

30 En un primer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una población de células progenitoras multipotentes derivadas del amnios no inmunogénicas (células AMP) que son células epiteliales que son positivas para la expresión de citoqueratinas y negativas para la expresión de CD34, en la que la población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales se prepara con el método de:

- 35 (a) disociar células AMP que son células epiteliales de una membrana amniótica de un amnios aislado de una placenta;
- (b) recoger las células AMP disociadas que son células epiteliales; y
- (c) cultivar las células AMP recogidas que son células epiteliales en medio de cultivo que no contiene materiales derivados de animal distintos de proteínas humanas;

40 en la que las células AMP no inmunogénicas son para su uso en la supresión, prevención o mejora de una respuesta inmunitaria en un sujeto que se podría beneficiar de la misma; y en la que la respuesta inmunitaria:

- 45 (a) es una respuesta autoinmunitaria tal como diabetes de Tipo I, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Grave, anemia hemolítica autoinmune, penfigoide ampolloso, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, pénfigo o anemia perniciosa; o
- (b) es una respuesta alogénica tal como enfermedad de injerto contra hospedador o enfermedad de hospedador contra injerto.

50 En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales que son positivas para la expresión de citoqueratinas y negativas para la expresión de CD34, en la que la población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales se prepara con el método de:

- 55 (a) disociar células AMP que son células epiteliales de una membrana amniótica de un amnios aislado de una placenta;
- (b) recoger las células AMP disociadas que son células epiteliales; y
- (c) cultivar las células AMP recogidas que son células epiteliales en medio de cultivo que no contiene materiales derivados de animal distintos de proteínas humanas

60 para su uso en la supresión, prevención o mejora de una respuesta inflamatoria en un sujeto que se podría beneficiar de la misma; y en la que la respuesta inflamatoria es:

- (a) una enfermedad inflamatoria del sistema tegumentario tal como psoriasis o dermatitis atópica;  
 (b) una enfermedad inflamatoria del intestino tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn; o  
 (c) una enfermedad reumática tal como osteoartritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, fibromialgia, esclerodermia, espondiloartropatías, gota, artritis infecciosa, polimialgia reumática, polimiositis, artritis psoriásica, bursitis, tendinitis, Síndromes Periódicos Autoinflamatorios relacionados con *CIAS1* (CAPS), enfermedad inflamatoria pélvica, cistitis intersticial, púrpura de Henoh-Schonlein o síndrome de Behcet.

En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición para su uso de acuerdo con el primer o segundo aspectos, en la que el sujeto es un ser humano o un animal no humano.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición para su uso de acuerdo con el primer o segundo aspectos, en la que:

- (a) la composición que comprende la población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales, se administra por vía tópica, por vía parenteral o por vía entérica, o  
 (b) la composición de una población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales que son positivas para la expresión de citoqueratinas y negativas para la expresión de CD34, se coadministra con uno o más agentes activos.

En un quinto aspecto, la invención proporciona una composición para su uso de acuerdo con el cuarto aspecto, en la que el uno o más agentes activos es corticosteroides, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, metotrexato, azatiopina, mercaptopurina, antibióticos citotóxicos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, interferón, opioides, proteínas de unión al TNF, micofenolato, FTY720 u otros tipos de células.

En un sexto aspecto, la invención proporciona una composición para su uso de acuerdo con el quinto aspecto, en la que los anticuerpos monoclonales son anticuerpos anti-receptores de linfocitos T (CD23) o anti-receptores de IL2 (CD25).

En un séptimo aspecto, la invención proporciona una composición para su uso de acuerdo con el primer o segundo aspectos, en la que la población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales que son positivas para la expresión de citoqueratinas y negativas para la expresión de CD34 es alogénica para el sujeto.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Reacción linfocitaria mixta (MLR). Células mononucleares de sangre periférica normales con respecto a células AMP con falta de coincidencia para HLA-DR (Clase II).

Figura 2: Respuesta de células mononucleares normales con respecto a mitógeno, MLR, y citomegalovirus (CMV) de antígeno de recuerdo más la adición de células AMP con falta de coincidencia para HLA-DR (Clase II).

Figura 3: Efectos de células AMP diluidas en serie en MLR Alo-Antígeno.

Figura 4: Efectos de células AMP diluidas en serie en respuesta de memoria a citomegalovirus (CMV).

### Definiciones

Como se define en el presente documento "aislado" se refiere a un material retirado de su entorno original y por lo tanto se ve alterado por "la mano del hombre" a partir de su estado natural.

Como se usa en el presente documento, la expresión "marcador proteico" se refiere a cualquier molécula de proteína característica de la membrana plasmática de una célula o, en algunos casos, de un tipo celular específico.

Como se usa en el presente documento, "enriquecido" se refiere concentrado de forma selectiva o para aumentar la cantidad del uno o más materiales por eliminación de los materiales no deseados o selección y separación de materiales deseados de una mezcla (es decir, separar células con marcadores celulares específicos a partir de una población de células heterogéneas en la que no todas las células en la población expresan el marcador).

Como se usa en el presente documento, la expresión "purificado sustancialmente" se refiere a una población de células sustancialmente homogéneas para un marcador o combinación de marcadores en particular. Por sustancialmente homogéneo se hace referencia a homogéneo en al menos un 90 %, y preferentemente un 95 % para un marcador o combinación de marcadores en particular.

El término "placenta" como se usa en el presente documento se refiere a placenta tanto pretérmino como término.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células totipotentes" tendrá significado que sigue a continuación. En mamíferos, las células totipotentes tienen el potencial de convertirse en cualquier tipo de célula en

el cuerpo adulto; cualquier tipo(s) de célula de las membranas extraembrionarias (por ejemplo, placenta). Las células totipotentes son el huevo fertilizado y aproximadamente las 4 primeras células producidas por su escisión.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "células madre pluripotentes" tendrá significado que sigue a continuación. Las células madre pluripotentes son células madre verdaderas con el potencial de hacer cualquier célula diferenciada en el cuerpo, pero no pueden contribuir a preparar los componentes de las membranas extraembrionarias que se obtienen a partir del trofoblasto. El amnios se desarrolla a partir del epiblasto, no del trofoblasto. Hasta la fecha se han confirmado tres tipos de células madre pluripotentes: Células Madre Embrionarias (ES) (también pueden ser totipotentes en primates), Células Germinales Embrionarias (EG), y Células de Carcinoma Embrionarias (EC). Estas células EC se pueden aislar a partir de teratocarcinomas, un tumor que ocasionalmente se produce en la gónada de un feto. A diferencia de las otras dos, normalmente son aneuploides.

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

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "tejido extraembrionario" se refiere a tejido localizado fuera del cuerpo embrionario que está implicado con la protección, nutrición, retirada de residuos, del embrión, etc. el tejido extraembrionario se descarta en el momento del nacimiento. El tejido extraembrionario incluye, pero no se limita al amnios, corión (trofoblasto y mesodermo extraembrionario incluyendo cordón umbilical y vasos), saco vitelino, alantoides y líquido amniótico (incluyendo todos los componentes contenidos en el mismo). El tejido extraembrionario y las derivadas del mismo tienen el mismo genotipo que el embrión en desarrollo.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "células extraembrionarias" o "células EE" se refiere a una población de células derivadas del tejido extraembrionario.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "células EHP" se refiere a una población de células derivadas del tejido extraembrionario que tienen las características de ser positivas para HLA-G después de su aislamiento, son negativas para la Clase II de MHC, no expresan las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y no son las MAPC como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N.º 20060263337.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula progenitora multipotente derivada del amnios" o "célula AMP" se refiere a una población de células epiteliales que se obtienen a partir del amnios. Además de las características que se han descrito anteriormente para las células EHP, las células AMP crecen sin capas alimentadoras, no expresan la proteína telomerasa y no son tumorigénicas. Las células AMP no expresan la proteína CD34 marcadora de células madre hematopoyéticas. La ausencia de células positivas para CD34 en esta población indica que los aislados no están contaminados con células madre hematopoyéticas tales como sangre del cordón umbilical o fibroblastos embrionarios. Prácticamente un 100 % de las células reaccionan con anticuerpos a citoqueratinas de bajo peso molecular, lo que confirma su naturaleza epitelial. Las células AMP recién aisladas no accionarán con anticuerpos para los marcadores de células madre/progenitoras, c-kit y Thy-1. En la técnica se conocen varios procedimientos usados para obtener células de placenta a término completo o pretérmino (véanse, por ejemplo, documento US 2004/0110287; Anker *et al.*, 2005, Stem Cells 22: 1338-1345; Ramkumar *et al.*, 1995, Am. J. Ob. Gyn. 172:493-500). Sin embargo, los métodos usados en el presente documento proporcionan composiciones y poblaciones de células mejoradas. Las células AMP se han descrito anteriormente como "células derivadas del amnios" (véanse las Solicitudes Provisionales de Estados Unidos N.º 60/666.949, 60/699.257, 60/742.067, Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 60/813.759, Solicitud de Estados Unidos N.º 11/333.849, Solicitud de Estados Unidos N.º 11/392.892, y documento PCTUS06/011392).

50 La expresión "composición de células extraembrionarias" como se usa en el presente documento incluye las células y composiciones que se describen en la presente solicitud y en los documentos US2003/0235563, US2004/0161419, US2005/0124003, Solicitudes Provisionales de Estados Unidos N.ºs 60/666.949, 60/699.257, 60/742.067, 60/813.759, Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 11/333.849, Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 11/392.892, documento PCTUS06/011392, documento US2006/0078993, documento PCT/US00/40052, Patente de Estados Unidos N.º 7.045.148, documento US2004/0048372, y documento US2003/0032179.

60 Con el término "sin animal", cuando se hace referencia a composiciones, condiciones de crecimiento, medios de cultivo, etc., descritos en el presente documento, se hace referencia a materiales no derivados de animales, tales como suero derivado de animal, distinto de materiales humanos, tales como proteínas humanas nativas o producidas de forma recombinante, se usan en la preparación, crecimiento, cultivo, expansión o formulación de la composición o proceso.

65 Con el término "expandida", por referencia a composiciones de células EHP, se hace referencia a que la población de células EHP constituye una concentración de células significativamente más elevada que la que se obtiene usando los métodos anteriores. Por ejemplo, el nivel de células por gramo de tejido amniótico en composiciones expandidas de células AMP es al menos 50 y hasta 150 veces más elevado que el número de células en el cultivo

primario después de 5 pasajes, en comparación con un aumento de aproximadamente 20 veces en las células de este tipo usando los métodos anteriores. En otro ejemplo, el nivel de células por gramo de tejido amniótico en composiciones expandidas de células AMP es al menos 30 y hasta 100 veces más elevado que el número de células en el cultivo primario después de 3 pasajes. Por consiguiente, una población "expandida" tiene una mejora de al menos 2 veces, y hasta 10 veces, en números de células por gramo de tejido amniótico con respecto a los métodos anteriores. El término "expandido" pretende cubrir solamente las situaciones en las que una persona ha intervenido para elevar el número de las células EHP. Como se usa en el presente documento, "pasaje" o "paso" se refiere a subcultivo de células. Por ejemplo, las células aisladas a partir del amnios se denominan células primarias. Las células de este tipo se expanden en cultivo al ser cultivadas en el medio de crecimiento que se describe en el presente documento. Cuando las células primarias de este tipo se subcultivan, cada ronda de subcultivo se denomina pasaje. Como se usa en el presente documento, "cultivo primario" se refiere a la población de células EHP recién aisladas.

Como se usa en el presente documento, "medio condicionado" es un medio en el que una célula específica o población de células se ha cultivado y a continuación se han retirado. Cuando las células se cultivan en un medio, éstas pueden secretar factores celulares que pueden proporcionar soporte o influir en el comportamiento de otras células. Los factores de este tipo incluyen, pero no se limitan a hormonas, citoquinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos, quimioquinas, receptores, inhibidores y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio condicionado. Los ejemplos de métodos de preparación de medios condicionados se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 6.372.494. Como se usa en el presente documento, el medio condicionado también se refiere a componentes, tales como proteínas, que se recuperan y/o se purifican a partir del medio condicionado o de células EHP incluyendo células AMP.

Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de citoquina celular derivada del amnios" o "ACCS" se refiere a medio condicionado que ha sido derivado de células AMP o células AMP expandidas. La ACCS se ha denominado anteriormente como "suspensión de citoquina celular derivada del amnios".

Como se usa en el presente documento, "actividad específica" se refiere a la actividad específica de las células EHP, incluyendo células AMP, y se determina mediante el cálculo de una dosificación de inhibición de un 50 % (DI<sub>50</sub>). Por ejemplo, usando un MLR de antígeno alogénico convencional, el 100 % de la respuesta se calcula mediante la determinación de la respuesta que responde a PBMC con respecto al estimulador con falta de coincidencia sin adición de células AMP. A continuación, las células AMP se valoran en la MLR a diluciones en serie de 1:2. El número de células AMP requeridas para la mitad de la respuesta de un 100 % se informa como la DI<sub>50</sub>.

El término "lisado", como se usa en el presente documento, se refiere a la composición obtenida cuando las células, por ejemplo, células EHP, se lisan y opcionalmente los desechos celulares (por ejemplo, membranas celulares) se retiran. Esto se puede conseguir por medios mecánicos, mediante congelación y descongelación, mediante el uso de detergentes, tales como EDTA, o mediante digestión enzimática usando, por ejemplo, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas.

Como se usa en el presente documento, el término "sustrato" se refiere a un revestimiento definido sobre una superficie al que las células se unen, crecen y/o migran. Como se usa en el presente documento, el término "matriz" se refiere a sustancia en la que las células crecen o sobre la que se pueden definir o no en sus componentes. La matriz incluye sustancias tanto biológicas como no biológicas. Como se usa en el presente documento, el término "armazón" se refiere a una estructura tridimensional (sustrato y/o matriz) en la que las células crecen en o sobre la misma. Puede estar formada por componentes biológicos, componentes sintéticos o una combinación de ambos. Además, puede estar construida de forma natural por células o construida de forma artificial. Además, el armazón puede contener componentes con actividad biológica en condiciones apropiadas.

La expresión "producto celular" o "productos celulares", como se usa en el presente documento se refiere a todas y cada una de las sustancias preparadas y secreta por una célula, que incluyen, pero no se limitan a, factores proteicos (es decir, factores de crecimiento, factores de diferenciación, factores de injerto, citoquinas, morfógenos, proteasas (es decir, para estimular la deslaminación celular endógena, inhibidores de proteasa), componentes de la matriz extracelular (es decir, fibronectina, etc.).

El término "trasplante" se refiere a la administración de una composición ya sea en una forma indiferenciada, parcialmente diferenciada, o totalmente diferenciada en un ser humano u otro animal.

Como se usa en el presente documento, los términos "un" o "uno" se refieren a uno o más; al menos uno.

Como se usa en el presente documento, el término "auxiliar" se refiere a conjuntamente, junto con, además de, en conjunto con, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "coadministrar" puede incluir la administración simultánea o secuencial de dos o más agentes. Como se usa en el presente documento, el término "singeneico" se refiere a miembros genéticamente idénticos de la misma especie.



Como se usa en el presente documento, el término "alogénico" se refiere a variación en alelos entre miembros de la misma especie.

5 Como se usa en el presente documento, las expresiones "fármacos inmunosupresores" o "inmunosupresores" son fármacos que se usan en terapia inmunosupresora para inhibir o prevenir la actividad del sistema inmunológico.

10 Como se usa en el presente documento, el término "GVHD" se refiere a una enfermedad de injerto contra hospedador, que se refiere a los procesos que se producen principalmente en un hospedador inmunocomprometido cuando es reconocido como no propio por las células inmunocompetentes de un injerto.

Como se usa en el presente documento, el término "HVG" se refiere a una respuesta de hospedador contra injerto, que se refiere a los procesos que se producen cuando un hospedador rechaza un injerto. Por lo general, HVG se activa cuando un injerto es reconocido como extraño (no propio) por las células inmunocompetentes del hospedador.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "inflamación" o "respuesta inflamatoria" se refieren a la reacción que se produce en las células afectadas y tejidos adyacentes como respuesta a una lesión o estimulación anómala causada por una sustancia física, química o biológica.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a las células, tejidos y factores proteínicos (es decir, citoquinas) implicados en el reconocimiento y ataque de sustancias extrañas dentro del cuerpo de un animal.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a que los componentes, además del agente terapéutico, que comprenden la formulación, son adecuados para su administración al paciente que se está tratando de acuerdo con la presente invención.

30 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" están reconocidas en la técnica y se refieren a modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, pero no se limitan a, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, e intraesternal.

35 Como se usa en el presente documento "sujeto" puede hacer referencia a cualquiera de un ser humano o animal no humano.

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

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína terapéutica" incluye una amplia gama de proteínas biológicamente activas que incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento, enzimas, hormonas, citoquinas, inhibidores de citoquinas, factores de coagulación sanguínea, crecimiento de péptidos y factores de diferenciación.

45 "Tratamiento", "tratar" o "que trata", tal como se usan en el presente documento cubren cualquier tratamiento de una enfermedad o afección de un mamífero, en particular un ser humano, e incluyen: (a) evitar que se produzca la enfermedad o afección en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o afección pero que todavía no se ha sido diagnosticado como si lo tuviera; (b) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo; (c) aliviar y/o mejorar la enfermedad o afección, es decir, causar la regresión de la enfermedad o afección; o (d) curar la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo o progresión. Los sujetos tratados con los métodos de la invención incluyen sujetos que padecen de la afección o enfermedad indeseable, así como sujetos en riesgo de desarrollo de la afección o enfermedad.

### Descripción detallada

55 De acuerdo con la presente divulgación, se pueden usar técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, y de ADN recombinante dentro de la experiencia en la técnica. Las técnicas de este tipo se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual".

60 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto no indique claramente de otro modo, entre el límite superior e inferior de este intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está incluido dentro de la divulgación. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos de forma independiente en los intervalos más pequeños que también están incluidos dentro de la divulgación, sujeto a cualquier excluido de forma específica en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que incluyen cualquiera de ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la divulgación.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende alguien con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método o material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento también se puede usar en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales precedentes se describen a continuación.

Se debe indicar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

## 10 Aplicaciones Terapéuticas

Se ha encontrado que cantidades relativamente pequeñas de células EHP pueden suprimir las respuestas inflamatorias e inmunitarias. Por consiguiente, se desvelan composiciones y métodos para tratar, mejorar, y/o prevenir o eliminar, respuestas adversas inmunitarias, tales como las que se producen en terapias de trasplante. La baja inmunogenicidad de las células EHP alogénicas, su capacidad para suprimir las respuestas inflamatorias e inmunitarias adversas y su alta actividad específica (como se define en las definiciones y en cualquier parte en el presente documento) las hace particularmente valiosas para terapias adicionales en el tratamiento de tales enfermedades. Las células EHP también son útiles como terapias inmunosupresoras adicionales para el tratamiento de respuestas inmunitarias adversas que se producen en terapia de trasplante (es decir, HVG y GVHD). Otros trastornos y enfermedades inmunitarios se discuten con más detalle en cualquier parte en el presente documento. Además, las células EHP pueden ser útiles en terapia inmunosupresora adicional en el tratamiento de ciertas enfermedades inflamatorias. Dichas enfermedades se discuten con mayor detalle a continuación y en otras partes de la memoria descriptiva. Se debería observar que las enfermedades y afecciones que se discuten a continuación pretenden ser ejemplos de enfermedades y afecciones adecuadas que se pueden tratar con los métodos de la divulgación. Los expertos en la materia reconocerán que el tratamiento de otras muchas enfermedades y afecciones relacionadas también se contemplan mediante los métodos de la divulgación.

Usando los métodos que se describen en el presente documento para el aislamiento, caracterización y expansión de células EHP, junto con la divulgación de las propiedades inmunosupresoras de células EHP, las células EHP se pueden usar para prevenir, suprimir, o disminuir trastornos, disfunciones, enfermedades inmunitarios, que incluyen, por ejemplo, reacciones inmunitarias adversas, tales como las que resultan de otras terapias, incluyendo aquellas que complican las terapias de trasplante, tales como HVG y GVHD. Tales trastornos, disfunciones, enfermedades también incluyen trastornos inmunitarios congénitos y enfermedades autoinmunes, entre otros. Las células EHP son útiles tanto como agentes terapéuticos primarios como adicionales. Las células EHP se pueden usar de forma terapéutica solas o junto con otros agentes; se pueden administrar antes, durante, y/o después de tales agentes; se pueden usar solas o con otros agentes; se pueden administrar antes, durante, y/o después de un trasplante. Si se administran durante el trasplante, las células EHP se pueden administrar junto con el material del trasplante o por separado. Si se administran por separado, las células EHP se pueden administrar de manera secuencial o simultánea con el trasplante. Además, las células EHP se pueden administrar antes del trasplante y/o después del trasplante. Otros agentes que se pueden usar en conjunto con las células EHP, en terapias de trasplante en particular, incluyen agentes inmunomoduladores. En el presente documento se describe una diversidad de agentes de este tipo. En elementos de la divulgación, los agentes inmunomoduladores son agentes inmunosupresores, tales como los que se describen en cualquier parte en el presente documento.

En elementos de la divulgación, las células EHP se administran mediante inyección, tal como mediante inyección intravenosa; se encapsulan para su administración; se administran *in situ* (es decir, trasplante de órganos sólidos y reparación de órganos). Estas y otras formas de administración se discuten con detalle en cualquier parte en el presente documento. En algunas divulgaciones, las células EHP se administran en dosis medidas mediante la proporción de células EHP (células) con respecto a masa corporal (peso). Como alternativa, se pueden administrar en dosis de un número fijo de células. La dosificación, vías de administración, formulaciones y similares se discuten con mayor detalle en cualquier parte en el presente documento.

Debido a sus nuevas propiedades inmunomoduladoras, las células EHP, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las mismas, lisados celulares derivados de las mismas, o productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, o en combinación con otros agentes activos, son particularmente útiles en la prevención y/o la mejora de la respuesta inflamatoria y/o respuestas inmunitarias y/o reacciones alérgicas. Las respuestas inflamatorias se caracterizan por la dilatación de los vasos sanguíneos en la zona afectada, lo que da como resultado un aumento del flujo sanguíneo a la zona. Si se produce en la superficie, hace que la piel se vea roja y se sienta caliente. Los capilares en la zona se vuelven más permeables permitiendo que el fluido se filtre en el tejido circundante dando como resultado un hinchamiento edematoso alrededor del sitio infectado. La hinchazón y los efectos de algunos de los productos químicos liberados dan como resultado dolor. Por lo tanto, las características clínicas de la respuesta inflamatoria se conocen como enrojecimiento, calor, edema y dolor. La respuesta inflamatoria se produce como resultado de mensajes químicos producidos por "mediadores". Existen dos clases principales de mediadores: 1) mediadores derivados de células que son producidos por leucocitos y 2) mediadores derivados de plasma que se encuentran en el plasma sanguíneo. Los mediadores derivados de células incluyen derivados del ácido araquidónico (es decir, prostaglandinas y leucotrienas), citoquinas,

linfoquinas y monoquinas, interleuquina, factor activador de plaquetas (PAF), histamina y bradiquinina. Los mediadores derivados de plasma incluyen complemento e interferones. Las respuestas inflamatorias pueden ser de naturaleza genética (es decir CAPS, vías y a continuación para más detalles). Se pueden inducir de forma ambiental o se pueden inducir de forma vírica. Los ejemplos no limitantes de enfermedades que tienen respuestas inflamatorias que son adecuadas para el tratamiento con células EHP, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las mismas, lisados celulares derivados de las mismas, o productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, incluyendo en combinación con otros agentes activos, incluyen los siguientes:

10 Enfermedades Inflamatorias del Sistema Tegumentario que incluyen psoriasis y eccema (es decir, dermatitis atópica). La psoriasis es una enfermedad inflamatoria de la piel. Hay cinco tipos, cada uno con signos y síntomas únicos. Entre un 10 % y un 30 % de las personas que desarrollan psoriasis presentan una forma relacionada de artritis denominada "artritis psoriásica", que produce inflamación en las articulaciones. La psoriasis en placas es el tipo de psoriasis más común. Aproximadamente un 80 % de las personas que desarrollan psoriasis tienen psoriasis en placas, que aparece como parches de piel elevada y rojiza cubiertos de escamas de color blanco plateado. Estos parches, o placas, se forman frecuentemente en los codos, rodillas, espalda baja y cuero cabelludo. Sin embargo, se pueden producir en cualquier parte del cuerpo. Los otros tipos son psoriasis en gotas (pequeñas manchas rojas en la piel), psoriasis pustular (pústulas de color blanco rodeadas de piel de color rojo), psoriasis inversa (se forman lesiones lisas y rojas formadas en pliegues cutáneos) y psoriasis eritrodérmica (enrojecimiento generalizado, picor intenso y dolor). Independientemente del tipo, la psoriasis suele causar molestias. La piel a menudo pica, y puede romperse y sangrar. En casos severos, la picazón y la incomodidad pueden mantener a una persona despierta por la noche, y el dolor puede dificultar las tareas cotidianas. La psoriasis es una afección crónica, lo que significa para toda la vida, porque en la actualidad no hay cura. Las personas suelen experimentar a menudo brotes y remisiones a lo largo de su vida. El control de los signos y síntomas por lo general requiere terapia de por vida. Eccema es un término general que incluye diversas afecciones de piel inflamada. Una de las formas más comunes de eccema es la dermatitis atópica. Aproximadamente un 10-20 % de la población mundial se ve afectada por esta erupción crónica, recidivante y que produce mucho pico en algún momento de la infancia. Afortunadamente, muchos niños con eccema encuentran que la enfermedad se espacia y con frecuencia desaparece. En general, la dermatitis atópica irá y vendrá, a menudo basándose en factores externos. Aunque su causa es desconocida, parece que la afección es una respuesta anómala del sistema inmunológico del cuerpo. En las personas con eccema, la respuesta inflamatoria a las sustancias irritantes sobrereactúa, causando picazón y rascado. El eccema no es contagioso y, al igual que muchas enfermedades, en la actualidad no se puede curar. Sin embargo, para la mayoría de los pacientes la afección se puede controlar bien con tratamiento y evitando los desencadenantes.

35 Las Enfermedades Intestinales Inflamatorias (IBD) son enfermedades inflamatorias crónicas del tracto GI de etiología desconocida, e incluyen colitis ulcerosa (UC) y enfermedad de Crohn (CD), que también se conoce como enteritis regional, ileítis terminal o ileocolitis granulomatosa. La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, también llamado colon. En la colitis ulcerosa, el revestimiento interior (mucosa) del intestino se inflama y desarrolla úlceras (una úlcera es una llaga, lo que significa que es una herida abierta y dolorosa). La colitis ulcerosa a menudo es la más grave en la zona rectal, lo que puede causar diarrea frecuente. A menudo aparecen moco y sangre en las heces si el revestimiento del colon se ha dañado. La enfermedad de Crohn se diferencia de la colitis ulcerosa en las zonas del intestino que implica - más comúnmente afecta a la última parte del intestino delgado denominado el íleon terminal y partes del intestino grueso. Sin embargo, no se limita a estas zonas y puede atacar a cualquier parte del tracto digestivo. La enfermedad de Crohn causa inflamación que se extiende mucho más profundo en las capas de la pared intestinal que la colitis ulcerosa. En general, la enfermedad de Crohn tiende a afectar a toda la pared intestinal, mientras que la colitis ulcerosa solo afecta al revestimiento del intestino.

Las Enfermedades Reumáticas abarcan muchas enfermedades incluyendo:

50 Osteoartritis - Este es el tipo más común de artritis, que afecta a como una estimación a 21 millones de adultos en Estados Unidos. La osteoartritis afecta principalmente al cartílago, que es el tejido que amortigua los extremos de los huesos dentro de la articulación. En la osteoartritis, el cartílago comienza a desgastarse y se puede desgarrar por completo. La osteoartritis puede causar dolor y rigidez en las articulaciones. Más frecuentemente, la discapacidad aparece cuando la enfermedad afecta a la columna vertebral y a las articulaciones portadoras de peso (las rodillas y caderas).

60 Artritis reumatoide - Esta enfermedad inflamatoria de la sinovia, o revestimiento de la articulación, da como resultado dolor, rigidez, hinchazón, daño articular y pérdida de la función de las articulaciones. La inflamación afecta con mayor frecuencia a las articulaciones de las manos y los pies y tiende a ser simétrica (produciéndose igualmente en ambos lados del cuerpo). Esta simetría ayuda a distinguir la artritis reumatoide de otras formas de la enfermedad. Aproximadamente un 1 por ciento de la población de Estados Unidos (aproximadamente 2,1 millones de personas) tiene artritis reumatoide.

65 Artritis reumatoide juvenil - Esta es la forma más común de artritis en la infancia, causando dolor, rigidez, hinchazón y pérdida de función de las articulaciones. La artritis puede estar asociada con erupciones cutáneas o fiebres, y puede afectar a varias partes del cuerpo.

Fibromialgia - La fibromialgia es un trastorno crónico que causa dolor a través de los tejidos que sostienen y mueven los huesos y las articulaciones. Dolor, rigidez y puntos sensibles localizados aparecen en los músculos y tendones, en particular los del cuello, columna vertebral, hombros y caderas. Los pacientes también pueden experimentar fatiga y trastornos del sueño.

5 Esclerodermia - También conocida como esclerosis sistémica, esclerodermia significa literalmente "piel dura". La enfermedad afecta a la piel, vasos sanguíneos y articulaciones. También puede afectar a órganos internos, tales como pulmones y riñones. En la esclerodermia, hay una producción anómala y excesiva de colágeno (una proteína similar a la fibra) en la piel u órganos internos.

10 Espondiloartropatías - Este grupo de enfermedades reumáticas afecta principalmente a la columna vertebral. Una forma común -- espondilitis anquilosante - no solo afecta a la columna vertebral, sino que también puede afectar las caderas, hombros y rodillas a medida que los tendones y los ligamentos alrededor de los huesos y las articulaciones se inflaman, dando como resultado dolor y rigidez. La espondilitis anquilosante tiende a afectar a las personas en la adolescencia tardía o en la época adulta temprana. La artritis reactiva, en ocasiones denominada síndrome de Reiter, es otra espondiloartropatía. Se desarrolla después de una infección que involucra al tracto urinario inferior, intestino, u otro órgano y se asocia comúnmente a problemas oculares, erupciones cutáneas y llagas en la boca.

15 Gota - Este tipo de artritis aparece debido a depósitos de cristales de ácido úrico en forma de aguja en las articulaciones. Los cristales causan inflamación, hinchazón y dolor en la articulación afectada, que es a menudo el dedo gordo del pie.

20 Artritis infecciosa - Este es un término general usado para describir formas de artritis que son causadas por agentes infecciosos, tales como bacterias o virus. La artritis por parvovirus y la artritis gonocócica son ejemplos de artritis infecciosa. Los síntomas de la artritis también se pueden producir en la enfermedad de Lyme, que está causada por una infección bacteriana después de la picadura de ciertas garrapatas. En aquellos casos de artritis causada por bacterias, el diagnóstico temprano y el tratamiento con antibióticos son fundamentales para deshacerse de la infección y minimizar el daño a las articulaciones.

25 Polimialgia reumática - Dado que esta enfermedad involucra a tendones, músculos, ligamentos y tejidos alrededor de la articulación, los síntomas suelen incluir dolor, malestar y rigidez matutina en los hombros, caderas, cuello y espalda baja. A veces es el primer signo de arteritis de células gigantes, una enfermedad de las arterias caracterizada por inflamación, debilidad, pérdida de peso y fiebre.

30 Polimiositis - Se trata de una enfermedad reumática que causa inflamación y debilidad en los músculos. La enfermedad puede afectar a todo el cuerpo y causar discapacidad.

35 Artritis psoriásica - Esta forma de artritis se produce en algunos pacientes con psoriasis, un trastorno cutáneo con formación de escamas. La artritis psoriásica a menudo afecta a las articulaciones en los extremos de los dedos de las manos y los pies y va acompañado por cambios en las uñas de las manos y las uñas de los pies. El dolor de espalda puede aparecer si la espina dorsal está implicada.

40 Bursitis - Esta afección consiste en la inflamación de las bolsas sinoviales, pequeños sacos llenos de líquido que ayudan a reducir la fricción entre los huesos y otras estructuras móviles en las articulaciones. La inflamación puede resultar de la artritis en la articulación o lesión o infección de las bolsas sinoviales. La bursitis produce dolor y sensibilidad y puede limitar el movimiento de las articulaciones cercanas.

45 Tendinitis (Tendonitis) - Esta afección se refiere a una inflamación de los tendones (cuerdas duras de tejido que conectan el músculo al hueso) causada por el uso excesivo, lesión, o una afección reumática. La tendinitis produce dolor y sensibilidad y puede limitar el movimiento de las articulaciones cercanas.

50 Enfermedad inflamatoria pélvica (PID) - Es un término general que se refiere a una infección e inflamación del tracto genital superior en mujeres. Puede afectar al útero (matriz), trompas de Falopio (tubos que llevan los óvulos desde los ovarios hasta el útero), ovarios y otros órganos relacionados con la reproducción. La cicatrización que aparece en estos órganos puede conducir a infertilidad, embarazo tubárico (ectópico), dolor pélvico crónico, abscesos (úlceras que contienen pus) y otros problemas graves. La PID es la causa prevenible más común de infertilidad en Estados Unidos.

55 Síndromes Periódicos Autoinflamatorios *relacionados con CIAS1* (CAPS) - es un espectro de afecciones inflamatorias hereditarias raras, que incluyen Síndrome Autoinflamatorio Familiar Frío (FCAS), Síndrome de Muckle-Wells (MWS) y Enfermedad Inflamatoria Multisistémica de Aparición Neonatal (NOMID). Estos síndromes se caracterizan por una inflamación sistémica espontánea y se denominan trastornos autoinflamatorios. Una nueva característica de estas afecciones (en particular FCAS y MWS) es que la exposición a grados leves de temperatura fría puede provocar un episodio inflamatorio importante que se produce en horas. Los CAPS están causados por una serie de mutaciones en el gen *CIAS1* (también conocido como NALP3).

60

65

Las enfermedades inflamatorias diversas incluyen cistitis intersticial, púrpura de Henoh-Schonlein, y síndrome de Behcet.

5 Los ejemplos no limitantes de enfermedades que tienen respuestas inmunitarias que son adecuadas para tratamiento con células EHP, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las mismas, lisados celulares derivados de las mismas, o productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, incluyendo junto con otros agentes activos, incluyen:

10 GVHD se refiere a enfermedad de injerto contra hospedador, lo que hace referencia a los procesos que se producen principalmente en un hospedador inmunocomprometido cuando se reconoce como no propio por células inmunocompetentes de un injerto.

15 HVG se refiere a una respuesta de hospedador contra injerto, lo que hace referencia a los procesos que se producen cuando un hospedador rechaza un injerto. Por lo general, HVG se activa cuando un injerto es reconocido como extraño (no propio) por células inmunocompetentes del hospedador.

20 La Diabetes Juvenil (Tipo I) se produce cuando el cuerpo forma anticuerpos que atacan a las células beta en los islotes de Langerhans en el páncreas. Dado que las células beta son responsables de la producción de insulina, los diabéticos de Tipo I se deben inyectar insulina ellos mismos durante toda su vida.

El lupus sistémico eritematoso (también conocido como lupus o SLE) es una enfermedad autoinmune en la que el sistema inmunológico daña las propias células y tejidos sanos del cuerpo. Esto puede dar como resultado inflamación y daño a las articulaciones, piel, riñones, corazón, pulmones, vasos sanguíneos y cerebro.

25 La enfermedad de Grave está causada por una respuesta anómala del sistema inmunológico que ataca a la glándula tiroidea y causa demasiada producción de hormonas tiroideas. Los factores de riesgo son ser una mujer de más de 20 años de edad, aunque el trastorno se puede producir a cualquier edad y también puede afectar a los hombres.

30 Los trastornos inmunitarios diversos incluyen anemia hemolítica autoinmune, penfigoide ampolloso, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, pénfigo, y anemia perniciosa.

35 Las reacciones alérgicas son sensibilidades a una sustancia específica, denominada alérgeno, que se pone en contacto a través de la piel, se inhala en los pulmones, se traga o se inyecta. Las reacciones alérgicas varían. Pueden ser leves o graves. Se pueden limitar a una pequeña zona del cuerpo o pueden afectar a todo el cuerpo. La mayoría se producen en segundos o minutos después de la exposición al alérgeno, pero algunas se pueden producir después de varias horas, en particular si el alérgeno produce una reacción después de su digestión parcial. En casos muy raros, las reacciones se desarrollan después de 24 horas. La anafilaxis es una reacción alérgica repentina y severa que se produce a los minutos de la exposición. Para esta afección se necesita atención médica inmediata. Puede empeorar mucho, muy rápido y conducir a la muerte en 15 minutos si no se recibe el tratamiento.

40 Enfoques generales para trasplante/terapias basadas en células

45 Un experto en la materia reconocerá que la expresión de HLA-G por células es importante en la capacidad de una célula para evadir la inmunovigilancia. Por lo tanto, cualquier célula que exprese HLA-G es potencialmente útil en la práctica de los métodos de la invención. Por lo tanto, además de las células EHP y las células AMP, se incluyen células tales como ciertas células tumorales (véase, por ejemplo, Tripathi, P. y Agrawal, S., Cancer Invest 2006, 24 (2):178-186; Blaschitz, A., *et al.*, Human Immunology 2000, 61: 1074-1085), ciertas células en el timo (véase, por ejemplo, Mallet, V., *et al.*, Int Immunol 1999, 11: 889-898; Mallet, V., *et al.*, Reprod Immunol 1999, 43 (2): 225-234) y células positivas para HLA-G derivadas de placenta no progenitora (Blaschitz, A., *et al.*, Human Immunology 2000, 61: 1074-1085).

Aislamiento, identificación y caracterización de células EHP

55 En la técnica se describen diversos métodos para aislar células a partir de tejido extraembrionario, que a continuación se pueden usar para producir las células EHP de la divulgación (véanse, por ejemplo, los documentos US2003/0235563, US2004/0161419, US2005/0124003, Solicitudes Provisionales de Estados Unidos N.º 60/666.949, 60/699.257, 60/742.067, 60/813.759, Solicitud de Estados Unidos N.º 11/333.849, Solicitud de Estados Unidos N.º 11/392.892, documentos PCTUS06/011392, US2006/0078993, PCT/US00/40052, documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.045.148, documento US2004/0048372, y documento US2003/0032179).

60 Identificación de células EHP - Una vez que se aíslan las células EE, es necesario identificar qué células tienen las características asociadas con las células EHP. Por ejemplo, las células se someten a ensayo para la presencia de HLA-G, la ausencia de antígenos de la Clase II de MHC, y la ausencia de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86.

65 Aislamiento, identificación y caracterización de células AMP

De acuerdo con la invención, las composiciones de células AMP se preparan usando las etapas de a) recuperación del amnios de la placenta, b) disociación de las células de la membrana amniótica, c) cultivo de las células en un medio basal con la adición de una proteína humana obtenida de forma natural o producida de forma recombinante; y opcionalmente d) proliferación adicional de las células usando aditivos adicionales y/o factores de crecimiento. Los detalles están contenidos en la Publicación de Estados Unidos N.º 2006-0222634-A1.

Las células AMP de la divulgación se caracterizan como sigue a continuación: Usando anticuerpos disponibles en el mercado para marcadores de células madre conocidos, las células AMP recién aisladas se han caracterizado ampliamente. En resumen, las células AMP recién aisladas son sustancialmente negativas con respecto a CD90 y CD117. Además, dichas poblaciones de células son esencialmente negativas para la expresión proteica de CD34, CD44, CD45, CD140b, CD105; esencialmente positivas para la expresión de proteínas de CD9 y CD29; entre aproximadamente un 70-95 % positivas para la expresión de proteínas de SSEA4, CD10, CD166 y CD227; entre aproximadamente un 60-95 % positivas para la expresión de proteínas de HLA-G, EGFR y CD26; y entre aproximadamente un 10-50 % positivas para la expresión de proteínas de CD71. Los detalles sobre este procedimiento están contenidos en la Publicación de Estados Unidos N.º 2006-0222634-A1.

En realizaciones alternativas se pueden crear poblaciones de células AMP sustancialmente purificadas usando anticuerpos frente a marcadores de proteína expresada (selección positiva) o no expresada (selección negativa) en la superficie celular de las células AMP. Estos anticuerpos se pueden usar para identificar, caracterizar, aislar o crear tales poblaciones sustancialmente purificadas de células AMP que expresan esos marcadores de proteína usando una diversidad de métodos. Los detalles sobre este procedimiento están contenidos en la Publicación de Estados Unidos N.º 2006-0222634-A1.

Además, los marcadores de proteínas que no se expresan en la superficie de las células AMP también se pueden usar para identificar, aislar o crear poblaciones de células AMP que no expresan esos marcadores. Los procedimientos de este tipo pueden implicar un método de selección negativa, tal como el paso de células de muestra sobre una columna que contiene anticuerpos marcadores antiproteína o por unión de células a anticuerpos conjugados con perlas magnéticas a los marcadores de proteína o mediante exploración en placas revestidas con anticuerpos marcadores de proteína y recogiendo de las células no unidas. Como alternativa, una suspensión de una sola célula puede estar expuesta a uno o más anticuerpos etiquetados con fluorescencia que se unen de forma inmuno-específica para los marcadores de proteína. Los detalles sobre este procedimiento están contenidos en la Publicación de Estados Unidos N.º 2006-0222634-A1.

#### Poblaciones expandidas de células EHP, incluyendo células AMP

Un experto en la materia reconocerá que cualquiera de las células EHP desveladas se pueden expandir usando los métodos que se describen a continuación para las células AMP.

Como se describe en el presente documento y en la Publicación de Estados Unidos N.º 2006-0222634-A1, los Solicitantes han descubierto un nuevo método para aislar y propagar células AMP multipotentes. Tales métodos dan como resultado composiciones de células AMP que se expanden para células multipotentes, proporcionando de ese modo, por primera vez, cantidades suficientes de células para permitir el trasplante de células terapéuticas. Las composiciones de células AMP expandidas son composiciones en las que el nivel de células por gramo de tejido amniótico es al menos 50 veces y hasta 150 veces mayor después de 5 pasajes, en comparación con aproximadamente 20 veces usando métodos anteriores. Como alternativa, las composiciones de células AMP expandidas son composiciones en las que el nivel de células por gramo de tejido amniótico es al menos 30 veces y hasta 100 veces mayor después de 3 pasajes.

Además, los métodos usados para cultivo y proliferación celular proporcionan un medio para cultivar las células, así como otras células que incluyen, pero no se limitan a células multipotentes, células pluripotentes o células totipotentes, que incluyen, pero no se limitan a, células madre embrionarias, en un sistema sin animal. Además, las condiciones de cultivo descritas proporcionan una célula que es menos dependiente de la unión a una superficie de cultivo para su viabilidad, permitiendo de este modo la propagación de las células usando el cultivo en suspensión para una ampliación eficaz. Los detalles sobre este procedimiento están contenidos en la Publicación de Estados Unidos N.º 2006-0222634-A1.

Las composiciones de células AMP expandidas que se describen en el presente documento demuestran un amplio potencial proliferativo, expresan ciertos genes que se sabe que se expresan solo en células indiferenciadas (es decir, Nanog y Oct-4) y pueden diferenciar tipos de células que normalmente surgen de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo). Este potencial de diferenciación sugiere que estas células AMP expandidas pueden ser capaces de contribuir a una diversidad de tipos de células. Las composiciones de células AMP que se describen en el presente documento también son útiles como capas de alimentación para el crecimiento de una diversidad de tipos de células, que incluyen, pero no se limitan a, células madre embrionarias (células ES). Las células AMP, incluyendo las que se describen en el presente documento, también producen una gran diversidad de citoquinas y factores de crecimiento, formando de ese modo tanto las composiciones celulares, medios condicionados derivados de las células (ACCS), lisados celulares de los mismos, matrices extracelulares

producidas por las células, y combinaciones de los mismos útiles para una diversidad de aplicaciones terapéuticas, en particular aplicaciones terapéuticas basadas en células tales como terapias de trasplante.

5 Además, las nuevas propiedades inmunomoduladoras poseídas por las composiciones de la divulgación y que se describen en el presente documento hacen que las composiciones sean útiles en entornos clínicos en los que está indicada la modulación de la respuesta inflamatoria y/o inmunitaria y/o tratamiento, evitando y/o mejorando las propiedades inflamatorias, inmunitarias y/o enfermedades y/o trastornos en un sujeto que lo necesite. Tales usos se consiguen mediante la administración de células EHP, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las mismas, lisados celulares derivados de las mismas y productos celulares derivados de las mismas, cada uno de ellos solo o en combinación, incluyendo entre sí y/o otros agentes activos adecuados. Los detalles adicionales sobre el potencial terapéutico de estas células y productos celulares están contenidos en la Publicación de Estados Unidos N.º 2006-0222634-A1.

15 Composiciones - Las composiciones de la divulgación incluyen poblaciones substancialmente purificadas de células EHP, incluyendo células AMP, así como lisados celulares y/o medios condicionados derivados de las mismas, solas o en combinación entre sí y/o otros agentes activos adecuados, y composiciones farmacéuticas de las mismas. Las composiciones de la invención se pueden preparar de diversas maneras dependiendo del uso pretendido de las composiciones. Por ejemplo, una composición útil para poner en práctica la divulgación puede ser un líquido que comprende un agente de la divulgación, es decir, una población substancialmente purificada de células EHP, en solución, en suspensión, o ambas (solución/suspensión). El término "solución/suspensión" se refiere a una composición líquida en la que está presente una primera porción del agente activo en solución y una segunda porción del agente activo está presente en forma de partículas, en suspensión en una matriz líquida. Una composición líquida también incluye un gel. La composición líquida puede ser acuosa o en forma de una pomada, unguento, crema, o similares.

25 Una suspensión acuosa o solución/suspensión útil para poner en práctica los métodos de la invención puede contener uno o más polímeros como agentes de suspensión. Los polímeros útiles incluyen polímeros solubles en agua tales como polímeros celulósicos y polímeros insolubles en agua tales como polímeros que contienen carboxilo reticulado. Una suspensión acuosa o solución/suspensión de la presente invención es preferentemente viscosa o mucoadhesiva, o aún más preferentemente, tanto viscosa como mucoadhesiva. Además, las composiciones se pueden combinar con otros agentes activos. Tales otros agentes activos incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunosupresores tales como ciclosporina, metotrexato, FK-506, corticosteroides y similares (véase a continuación).

35 Composiciones farmacéuticas - La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas de poblaciones substancialmente purificadas de células EHP, incluyendo células AMP, así como lisados celulares y/o medios condicionados derivados de las mismas, solas o en combinación entre sí y/o otros agentes activos adecuados, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal o listado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, vehículo con el que se administra la composición. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulgentes, o agentes tampón de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin, y también otros son familiares para los expertos en la materia.

50 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden formular como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libre tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con grupos carboxilo libre tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc. Además, las composiciones farmacéuticas se pueden combinar con uno o más agentes activos. Tales otros agentes activos incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunosupresores tales como ciclosporina, metotrexato, FK-506, corticosteroides y similares (véase a continuación).

60 Kits de Tratamiento - La divulgación también proporciona un artículo de fabricación que comprende un material de envasado y una composición farmacéutica de la divulgación contenida en el material de envasado, en el que la composición farmacéutica comprende una población substancialmente purificada de células EHP, incluyendo células AMP, así como lisados celulares y/o medios condicionados derivados de los mismos, solos o en combinación entre sí y opcionalmente en combinación con otros agentes activos y en el que el material de envasado comprende una etiqueta o prospecto que indica que la población substancialmente purificada de células EHP incluyendo células AMP, así como lisados celulares y/o medios condicionados derivados de los mismos, solos o en combinación entre sí se pueden usar para tratar una diversidad de trastornos que incluyen, pero no se limitan a, HVG, GVHD y otras

enfermedades y trastornos inflamatorios e inmunitarios, reacciones alérgicas, etc.

Las células EHP, incluyendo células AMP, así como lisados celulares y/o medios condicionados derivados de los mismos, solos o en combinación entre sí, son útiles como agentes y modalidades terapéuticos tanto primarios como  
 5 auxiliares. Dichas composiciones se pueden usar de forma terapéutica solas o en combinación con otros agentes. Las composiciones de este tipo se pueden administrar antes, durante, y/o después de tales agentes. De forma análoga, ya sea usadas solas o con otros agentes, las composiciones de este tipo se pueden administrar antes, durante, y/o después de un trasplante u otra terapia basada en células. Si se administran durante el trasplante u  
 10 otra terapia basada en células, las composiciones se pueden administrar en combinación con el trasplante u otro material de terapia basada en células, o se pueden administrar por separado. Si se administran por separado, las composiciones se pueden administrar de forma secuencial o de forma simultánea con el trasplante u otra terapia basada en células. Además, las composiciones se pueden administrar antes del trasplante u otra terapia basada en células y/o después del trasplante u otra terapia basada en células. Además, las composiciones se pueden  
 15 administrar como el trasplante. En las situaciones de este tipo, se pueden administrar solas o en combinación con otros agentes activos, etc.

#### Otros agentes útiles para la coadministración.

Las células EHP, incluyendo las células AMP, medios condicionados derivados de las mismas, lisados celulares  
 20 derivados de las mismas, productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación se pueden administrar con otros agentes farmacéuticamente activos. En algunas divulgaciones, uno o más de dichos agentes se formulan en combinación con las composiciones para su administración. En algunas otras divulgaciones, las composiciones y el uno o más agentes son formulaciones separadas. Además, en algunas otras divulgaciones, las composiciones que comprenden las células EHP, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las  
 25 mismas, lisados celulares derivados de las mismas, productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación y/o el uno o más agentes se formulan con respecto al uso auxiliar entre sí.

Las células EHP, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las mismas, lisados celulares  
 30 derivados de las mismas, o productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, se pueden administrar en una formulación que comprende agentes inmunosupresores, tales como cualquier combinación de cualquier número de corticosteroides (es decir glucocorticoides), ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, metotrexato, azatiopina, mercaptopurina, antibióticos citotóxicos, anticuerpos policlonales y monoclonales tales como anticuerpos anti-receptores de linfocitos (CD23) y anti-receptores de IL2 (CD25), interferón, opioides, proteínas de unión al TNF, micofenolato, y pequeños agentes biológicos tales como FTY720. Los agentes inmunosupresores de  
 35 acuerdo con lo mencionado anteriormente pueden ser los únicos agentes adicionales o se pueden combinar con otros agentes.

Los agentes de este tipo también incluyen agentes antibióticos, agentes antifúngicos y agentes antivirales, por  
 40 nombrar solo algunas otras sustancias farmacológicamente activas y composiciones que se pueden usar. Los antibióticos o compuestos antimicóticos habituales incluyen, pero no se limitan a, penicilina, estreptomycin, anfotericina, ampicilina, gentamicina, kanamicina, ácido micofenólico, ácido nalidixico, neomicina, nistatina, paromomicina, polimixina, puromicina, rifampicina, espectinomycin, tetraciclina, tilosina, zeocina y cefalosporinas, aminoglicósidos y equinocandinas.

Los agentes adicionales se pueden usar en conjunto con las células EHP, incluyendo las células AMP de la presente  
 45 invención, para dirigir las células a un sitio en particular, tal como uno de trastorno inmune, disfunción, o enfermedad, en los que podrían ser necesarios. Los agentes de este tipo pueden incluir factores de crecimiento y agentes de señalización tróficos, tales como citoquinas. Se pueden usar para atraer células EHP a sitios terapéuticamente dirigidos. Se pueden administrar a un sujeto antes del tratamiento con células EHP, junto con  
 50 células EHP, o después de que se administran las células EHP. Ciertas citoquinas, por ejemplo, alteran o afectan a la migración de células EHP o células diferenciadas a partir de las mismas a sitios con necesidad de terapia, tales como sitios inmunocomprometidos. Las citoquinas que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1), factor de células madre (SCF), angiopoyetina-1, factor de crecimiento derivado de placenta (PIGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), citoquinas que estimulan la  
 55 expresión de las moléculas de adhesión endotelial tales como las ICAM y las VCAM, y citoquinas que engendran o que facilitan el direccionamiento. Se pueden administrar a un sujeto como un tratamiento previo, junto con células EHP, incluyendo células AMP, o después de que se hayan administrado las composiciones, para estimular la migración a los sitios deseados y para conseguir un efecto terapéutico mejorado. Los factores de este tipo se pueden combinar con células EHP, incluyendo células AMP, solas o en combinación en una formulación adecuada para que se administren en conjunto. Como alternativa, los factores de este tipo se pueden formular y administrar  
 60 por separado.

El orden de administración, formulaciones, dosis, frecuencia de dosificación y vías de administración de factores  
 65 (tales como las citoquinas) y células EHP, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las mismas, lisados celulares derivados de las mismas, o productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, por lo general variarán con el trastorno o enfermedad que se está tratando, su gravedad, el sujeto,



5 otras terapias que se están administrando, el estadio del trastorno o enfermedad, y factores de pronóstico, entre otros. Los regímenes generales que se han establecido para otros tratamientos proporcionan un marco para determinar la dosificación adecuada en terapia directa o auxiliar mediada por células EHP. Estos, junto con la información adicional proporcionada en el presente documento, permitirán al experto en la materia determinar los procedimientos de administración adecuados sin experimentación excesiva.

### Vías y Formulaciones

10 Las composiciones que comprenden células EHP, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las mismas, lisados celulares derivados de las mismas, o productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, o células diferenciadas a partir de las mismas se pueden formular de cualquier manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Las composiciones de la invención se pueden envasar con instrucciones escritas para el uso de las células en la regeneración de tejidos, o para  
15 restablecer una función metabólica terapéuticamente importante. Las composiciones también se pueden administrar al receptor en uno o más vehículos fisiológicamente aceptables. Los vehículos de estas células pueden incluir, pero no se limitan a, soluciones de solución tampón fosfato salino (PBS) o solución de Ringer con lactato que contiene una mezcla de sales en concentraciones fisiológicas.

20 Un experto en la materia puede determinar fácilmente la concentración apropiada de células EHP, incluyendo células AMP, para un fin particular. El experto en la materia reconocerá que una dosis preferente es aquella que produce un efecto terapéutico, tal como suprimir una respuesta inflamatoria o inmunitaria, en un paciente con necesidad de la misma. Los expertos en la materia también reconocerán que todos y cada uno de los métodos y modalidades convencionales para terapias de trasplante basadas en tejidos, órganos y células actualmente en  
25 práctica clínica y desarrollo clínico son adecuados para poner en práctica los métodos de la invención. Además, las dosis apropiadas de células EHP, incluyendo células AMP, y lisados celulares derivados de las mismas y medios condicionados derivados de las mismas (es decir ACCS), y regímenes de dosificación son fácilmente determinados por los expertos en la materia y es necesaria su determinación de forma empírica en el momento de su uso basándose en varias variables que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad que se está tratando; edad del  
30 paciente, peso, sexo, salud; otros medicamentos y tratamientos que se están administrando al paciente; y similares. Las vías de administración, formulación, coadministración con otros agentes (si fuera apropiado) y similares se discuten con detalle en cualquier parte en el presente documento. Una dosis preferente está en el intervalo de aproximadamente  $0,25-2,0 \times 10^6$  células. Otros intervalos de dosis preferentes son  $0,1-10,0 \times 10^6$  células por centímetro cuadrado de área aplicada basándose en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha encontrado que cantidades relativamente pequeñas de células EHP pueden suprimir las respuestas inflamatorias e inmunitarias. Por  
35 ejemplo, solo 1.000-100.000 células AMP por reacción en MLR es suficiente para reducir la respuesta de los linfocitos T a potentes estimuladores en más de un 99 % *in vitro*.

40 Además, alguien con experiencia en la materia puede determinar fácilmente la concentración apropiada de medio condicionado, incluyendo, por ejemplo, ACCS, para un fin particular. Una dosis preferente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1000 microgramos por centímetro cuadrado de área aplicada. Otros intervalos de dosis preferentes son de 1,0 a 50,0 microgramos/área aplicada.

45 Las células EHP, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las mismas, lisados celulares derivados de las mismas, o productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, o células diferenciadas a partir de las mismas se pueden administrar mediante inyección en un sitio diana de un sujeto, preferentemente a través de un dispositivo de administración, tal como un tubo, por ejemplo, catéter. En una divulgación, el tubo contiene adicionalmente una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de la cual las células se pueden introducir en el sujeto en un lugar deseado. Los ejemplos específicos, no limitantes de la administración de  
50 células a sujetos también pueden incluir la administración mediante inyección subcutánea, inyección intramuscular, o inyección intravenosa. Si la administración es intravenosa, una suspensión líquida inyectable de células se puede preparar y administrar mediante un goteo continuo o como un bolo.

55 Las composiciones de la invención también se pueden insertar en un dispositivo de administración, por ejemplo, una jeringa, de diferentes formas. Por ejemplo, las células se pueden suspender en una solución contenida en tal dispositivo de administración. Como se usa en el presente documento, el término "solución" incluye un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que las células de la invención permanecen viables. Los vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones tampón acuosas, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de tales vehículos y diluyentes se conoce bien en la técnica. La solución es preferentemente estéril y fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de inyección. Preferentemente, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva frente a la acción contaminante de microorganismos tal como bacterias y hongos a través del uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. Las soluciones de la invención se pueden preparar mediante la incorporación de células EHP, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las mismas,  
60 lisados celulares derivados de las mismas, o productos celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, o células diferenciadas como se describe en el presente documento, en un vehículo o diluyente

farmacéuticamente aceptable y, si fuera necesario, otros ingredientes enumerados anteriormente, seguido de esterilización por filtración.

5 Las células EHP no diferenciadas, parcialmente diferenciadas o totalmente diferenciadas, incluyendo células AMP, medios condicionados derivados de las mismas, lisados celulares derivados de las mismas, cada uno solo o en combinación, se pueden administrar por vía sistémica (por ejemplo por vía intravenosa) o por vía local (por ejemplo directamente en un defecto miocárdico bajo guía ecocardiográfica o por aplicación directa bajo visualización durante la cirugía). Para las inyecciones de este tipo, las composiciones pueden estar en una preparación de suspensión líquida inyectable o en un medio biocompatible que sea inyectable en forma líquida y que se convierta en semisólido  
10 en el sitio del tejido dañado. Se puede usar una jeringa intracardiaca o un dispositivo de administración endoscópica controlable convencionales siempre y cuando el lumen o diámetro de la aguja sea de diámetro suficiente (por ejemplo, calibre 30 o mayor) de modo que las fuerzas de cizallamiento no dañen ninguna célula que se está suministrando.

15 Las matrices de soporte en las que se puede incorporar o embeber las células EHP, incluyendo células AMP, y/o lisados celulares y/o medios condicionados derivados de las mismas incluyen matrices que son compatibles con el receptor y que se degradan en productos que no son dañinos para el receptor. Estas matrices proporcionan soporte y protección para las células EHP indiferenciadas y diferenciadas *in vivo* y, por lo tanto, son la forma preferente en la que las células de este tipo se trasplantan en los sujetos receptores.

20 Las matrices biodegradables naturales y/o sintéticas son ejemplos de las matrices de este tipo. Las matrices biodegradables naturales incluyen coágulos de plasma, por ejemplo, derivados de matrices de un mamífero, colágeno, fibronectina y laminina. El material sintético adecuado para una matriz de trasplante de células debe ser biocompatible para evitar la migración y las complicaciones inmunológicas y debería ser capaz de soportar un amplio crecimiento celular y una función celular diferenciada. También debe ser reabsorbible, lo que permite un reemplazo de tejido completamente natural. La matriz debería ser configurable en una diversidad de formas y debería tener una resistencia suficiente para evitar el colapso tras el implante. Los estudios recientes indican que los polímeros de poliéster biodegradables hechos de ácido poliglicólico cumplen todos estos criterios (Vacanti, *et al.*, J. Ped. Surg. 23: 3-9 (1988); Cima, *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 38:145 (1991); Vacanti, *et al.*, Plast. Reconstr. Surg. 88: 753-9 (1991)).  
25 Otras matrices sintéticas de soporte biodegradables incluyen polímeros sintéticos tales como polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico. En la técnica también se conocen ejemplos adicionales de polímeros sintéticos y métodos para incorporar o embeber células en estas matrices. Véanse por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 4.298.002 y 5.308.701.

35 La unión de las células al polímero se puede aumentar revistiendo los polímeros con compuestos tales como componentes de la membrana basal, agar, agarosa, gelatina, goma arábiga, colágenos de tipo I, II, III, IV y V, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanos, mezclas de los mismos y otros materiales conocidos por los expertos en la materia de cultivo celular. Todos los polímeros para su uso en la matriz deben satisfacer los parámetros mecánicos y bioquímicos necesarios para proporcionar un soporte adecuado para las células con posterior crecimiento y proliferación. Los polímeros se pueden caracterizar con respecto a propiedades mecánicas tales como resistencia a la tracción usando una máquina de ensayo Instron, para el peso molecular de polímero mediante cromatografía de permeación en gel (GPC), temperatura de transición vítrea mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC) y estructura de enlace mediante espectroscopía de infrarrojos (IR) con respecto a la toxicología mediante ensayos de identificación sistemática que implican ensayos de Ames y ensayos de teratogenicidad *in vitro*,  
40 y estudios de implante en animales para estudios de inmunogenicidad, inflamación, liberación y degradación.

Una de las ventajas de una matriz polimérica biodegradable es que se pueden incorporar agentes angiogénicos y otros compuestos bioactivos directamente en la matriz de soporte de manera que se liberen lentamente a medida que la matriz de soporte se degrada *in vivo*. A medida que la estructura de célula-polímero se vasculariza y la estructura se degrada, las células EHP se pueden diferenciar de acuerdo con sus características inherentes. En la matriz se podrían incorporar o se podrían proporcionar en conjunto con la matriz algunos factores, incluyendo nutrientes, factores de crecimiento, inductores de diferenciación o desdiferenciación (es decir, hacer que las células diferenciadas pierdan características de diferenciación y adquieran características tales como proliferación y función más general), productos de secreción, inmunomoduladores, inhibidores de la inflamación, factores de regresión, compuestos biológicamente activos que potencian o permiten el crecimiento de la red linfática o fibras nerviosas, ácido hialurónico y fármacos que son conocidos por los expertos en la materia y que están disponibles en el mercado con instrucciones con respecto a lo que constituye una cantidad eficaz, de proveedores tales como Collaborative Research, Sigma Chemical Co., factores de crecimiento vascular tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina tal como el factor de crecimiento (HB-EGF). De forma análoga, se pueden sintetizar polímeros que contienen péptidos tales como el péptido de unión RGD (Arg-Gly-Asp) para su uso en la formación de matrices (véanse por ejemplo las Patentes de los Estados Unidos N.º 4.988.621, 4.792.525, 5.965.997, 4.879.237 y 4.789.734).  
55

65 En otro ejemplo, las células EHP no diferenciadas, parcialmente diferenciadas o totalmente diferenciadas, incluyendo las células AMP, se pueden trasplantar en una matriz de gel (tal como Gelfoam de Upjohn Company) que

se polimeriza para formar un sustrato en el que pueden crecer las células. Se han desarrollado diversas tecnologías de encapsulación (por ejemplo Lacy *et al.*, Science 254: 1782-84 (1991); Sullivan *et al.*, Science 252: 718-712 (1991); documento WO 91/10470; documento WO 91/10425; Patente de Estados Unidos N.º 5.837.234; Patente de Estados Unidos N.º 5.011.472; Patente de Estados Unidos N.º 4.892.538). Durante procedimientos quirúrgicos

5 abiertos, que implican acceso físico directo al tejido y/u órganos dañado, todas las formas descritas de preparaciones de administración de células EHP no diferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas son opciones disponibles. Estas células se pueden trasplantar repetidamente a intervalos hasta conseguir un efecto terapéutico deseado.

10 La divulgación también proporciona el suministro de células EHP, incluyendo composiciones de células AMP que se describen en el presente documento, en conjunto con cualquiera de las matrices de soporte mencionadas anteriormente, así como membranas derivadas del amnios. Las membranas de este tipo se pueden obtener como un subproducto del proceso que se describe en el presente documento para la recuperación de células AMP, o mediante otros métodos, tal como se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 6.326.019 que describe un método para fabricar, almacenar y usar un injerto quirúrgico de membrana amniótica humana, el

15 documento US 2003/0235580 que describe membranas amnióticas reconstituidas y recombinantes para suministro sostenido de moléculas, proteínas o metabolitos terapéuticos, a un sitio en un hospedador, el documento US 2004/0181240, que describe una cubierta de membrana amniótica para una superficie de tejido que puede prevenir adherencias, excluir bacterias o inhibir la actividad bacteriana, o estimular la cicatrización o crecimiento de tejido, y la

20 Patente de Estados Unidos N.º 4.361.552, que pertenece a la preparación de membranas amnióticas reticuladas y su uso y métodos para tratar quemaduras y heridas. Las células EHP se pueden cultivar en tales membranas, se pueden añadir a la membrana en una forma indiferenciada, parcialmente diferenciada o completamente diferenciada, o se pueden añadir medios condicionados o lisados celulares a las membranas de este tipo. Como alternativa, el tejido amniótico en el que las células AMP no se han separado se puede usar para suministrar células EHP a un sitio

25 en particular. En todos los casos, las células EHP se pueden usar en conjunto con tejido amniótico u otras matrices en combinación con otras células terapéuticamente útiles y/o células que expresan agentes terapéuticos biológicamente activos tales como los que se describen a continuación.

30 Las células EHP se pueden modificar genéticamente para producir una proteína terapéutica en particular. La proteína terapéutica incluye una amplia gama de proteínas biológicamente activas que incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento, enzimas, hormonas, citoquinas, inhibidores de citoquinas, factores de coagulación sanguínea, crecimiento de péptidos y factores de diferenciación. Las células diferenciadas en particular se pueden diseñar mediante ingeniería con una proteína que se expresa normalmente por el tipo de célula en particular. Por ejemplo, las células pancreáticas se pueden diseñar por ingeniería para producir enzimas digestivas. Los

35 hepatocitos se pueden diseñar para producir el inhibidor enzimático, A1AT, o factores de coagulación para tratar la hemofilia. Además, las células neuronales se pueden diseñar por ingeniería para producir transmisores químicos.

Los métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen un ácido nucleico que codifica la proteína de interés relacionada con las señales de control

40 de la transcripción/traducción apropiadas. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, ed., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III; Celis, ed., 1994.

Los métodos adecuados para transferir vector o plásmidos en células EHP o células diferenciadas de las mismas

45 incluyen complejos lipídico/ADN, tales como los que se describen en las Patentes de Estados Unidos N.ºs 5.578.475; 5.627.175; 5.705.308; 5.744.335; 5.976.567; 6.020.202; y 6.051.429. Los reactivos adecuados incluyen lipofectamina, una formulación liposómica 3:1 (p/p) del lípido policationico, trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermincarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino (DOSPA), (nombre de Registro en Chemical Abstracts: N-[2-(2,5-bis[(3-aminopropil)amino]-1-oxpentil)amino)etil]-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxi)-1-propanamin-

50 trifluoroacetato), y el lípido neutro dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) y agua filtrada por membrana. Una formulación a modo de ejemplo es Lipofectamine 2000™ (disponible en Gibco/Life Technologies N.º 11668019). Otros reactivos incluyen: Reactivo de Transfección FuGENE™ 6 (una mezcla de lípidos en forma no liposómica y otros compuestos en etanol al 80 %, obtenible en Roche Diagnostics Corp. N.º 1814443); y reactivo de transfección LipoTAXI™ (una formulación lipídica de Invitrogen Corp., N.º 204110). La transfección de células EHP se puede

55 realizar por electroporación, por ejemplo, como se describe en Roach y McNeish (Methods in Mol. Biol. 185:1 (2002)). Los sistemas de vectores virales adecuados para producir células madre con alteraciones genéticas estables se pueden basar en adenovirus, lentivirus, retrovirus y otros virus, y se pueden preparar usando componentes de virus disponibles en el mercado.

60 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no se deberían interpretar como limitantes dado que el alcance de la invención solo se puede determinar con las reivindicaciones.

### Ejemplos

65 Los siguientes ejemplos se establecen con el fin de proporcionar a las personas con experiencia habitual en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar los métodos y composiciones de la

invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores contemplan como su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se deberían tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular medio, la temperatura está en grados Centígrados, y la presión es o casi es la atmosférica.

Ejemplo 1: Caracterización de células progenitoras multipotentes derivadas del amnios (AMP) usadas en estudios

Para estudios inmunológicos, una caracterización adicional de los marcadores de superficie celular de las células AMP, una subpoblación distinta de células aisladas de amnios humano que se han crioconservado, cultivado y propagado, se realizó antes del examen de sus características inmunológicas. En estas condiciones, las células AMP son negativas para el antígeno CD117 (c-kit), distinguiendo las células AMP de las células derivadas de líquido amniótico, y son ~74 % positivas para CD90 y ~97 % de SSEA-4. Las células AMP también presentan tinción para CD9 (~81 %), CD10 (~64 %), CD29 (~100 %), CD104 (~100 %), CD49f (~100 %), CD105 (~12 %) y CD44 (~7 %), pero son negativas para marcadores hematopoyéticos, CD34 y CD45, y para el receptor de PDGF, CD140b. El análisis adicional se realizó para establecer un perfil inmunológico relevante para células AMP. Las células AMP expresaban moléculas de la clase I de MHC, sin embargo no negativas para la Clase II de MHC. Las células AMP también eran negativas para las moléculas coestimuladoras, CD80 y CD86 (B7-1 y B7-2, respectivamente). La expresión de estos marcadores no se veía afectada por la incubación en presencia de IFN- $\gamma$ . Se mostró que las células AMP tenían expresión de Fas, proporcionando posiblemente un mecanismo frente a células efectoras activadas de expresión de FasL *in vivo*. De forma coherente con otros hallazgos de células derivadas de placenta, se encontró que las células AMP eran positivas tanto para PD-L1 como para PD-L2 después de su exposición a IFN- $\gamma$ . Por último, las células AMP expresan el antígeno HLA-G de clase I de HLA no clásico, un componente fundamental de los efectos inmunomoduladores del propio del amnios. El HLA-G estará presente en ~60-90 % de células en el momento del aislamiento, y disminuía de forma gradual durante el pasaje. La expresión de HLA-G se regulaba de forma positiva mediante la adición de IFN- $\gamma$ . Las células AMP eran negativas, sin embargo, para los receptores de la clase I de HLA no clásicos, IL-T2, IL-T3, e IL-T4, en todos los momentos sometidos a ensayo. Estas moléculas se regulan de forma positiva por el propio HLA-G, pero la falta de estos receptores en las células AMP puede indicar la ausencia de cualquier regulación autocrina por HLA-G en la superficie celular.

Ejemplo 2: Inmunogenicidad de las células AMP: Reacción linfocitaria mixta (MLR). Células mononucleares periféricas normales con respecto a células AMP con falta de coincidencias de HLA-DR (Clase II)

El HLA-G es una molécula de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad no clásica (MHC) que tiene una distribución limitada por tejido. Se ha demostrado que para proporcionar una tolerancia materno-fetal se expresa en citotrofoblastos en la superficie de contacto feto-materna. El HLA-G también se expresa mediante ciertos linajes de cáncer, en los que puede tener un papel proporcionando un mecanismo de escape a la inmunovigilancia del organismo hospedador. Se ha mostrado (CMLS, 55, 1999, 327-333) que el HLA-G puede inhibir respuestas limitadas (linfocitos T) y no limitadas (linfocitos NK) por MHC a través de Receptores Inhibidores Citolíticos (KIR) expresados en los linfocitos y linfocitos NK. Esto incluye respuestas líticas, así como proliferativas. Por lo tanto, el HLA-G tiene propiedades inmunomoduladoras de las células que lo expresan y del entorno en el que se localizan estas células.

Los solicitantes han encontrado que las células AMP expresan de forma variable el marcador de superficie celular HLA-G al aislarse del amnios (> 60 %, n = 20); Sin embargo, la expresión de este marcador disminuye a medida que las células se cultivan con el tiempo. Cuando se añaden citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$  (100 IU/ml) solas o con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) e IL1 $\beta$  (10 ng/ml)) al cultivo, la expresión de HLA-G está regulada de forma positiva. Además, los marcadores de la Clase II de MHC (es decir, DR, DP, DQ) no se expresan por células AMP ya sea en el aislamiento o después del cultivo con o sin citoquinas proinflamatorias. Los solicitantes también han encontrado que las células AMP no expresan las moléculas coestimuladoras, CD80 y CD86, que son fundamentales en la señalización de una respuesta inmunitaria normal. Dado que las células AMP no tienen expresión de molécula de Clase II o coestimuladora de MHC y tienen una expresión de HLA-G en la superficie celular, se produce la teoría de que las células AMP no provocarán una respuesta inmunitaria de linfocitos T auxiliares y pueden tener propiedades inmunomoduladoras.

Para someter a ensayo esta hipótesis y determinar el potencial inmunogénico de las células AMP, tanto en el aislamiento como después del cultivo, las células se sometieron a ensayo en una reacción linfocitaria mixta convencional (MLR) (véase, por ejemplo, Bach, F.H., Hirschorn, H. "Lymphocyte interaction: A potential histocompatibility test in vitro. Science 1964; 143: 813-814. Bain, B., Vaz, MR, Lowenstein, L. "The development of large immature mononuclear cells in mixed lymphocyte cultures". Blood 1964; 23: 108-116. Jeras, M. "The role of in vitro alloreactive T-cell functional tests in the selection of HLA matched and mismatched haematopoietic stem cell donors". Transplant Immunology 2002; 10: 205-214).

Las poblaciones de células que respondieron consistieron en células mononucleares de sangre periférica aisladas de Ficoll-Hypaque. Se eligieron dos voluntarios normales (Que responde 1 y Que responde 2) con sitios de HLA-DR con faltas de coincidencia. Las poblaciones de células estimuladoras consistía en células AMP de las formaron tipos con tejido a nivel de ADN y se encontró que no tenían coincidencias con ambos voluntarios que responden normales.

Los voluntarios que responden normales también se usaron como estimuladores entre sí como un control positivo. Las poblaciones de células estimuladoras se irradiaron con 2000 Rads para evitar la proliferación durante la MLR unidireccional. Las células se mezclaron a 100.000 células que responden frente a 100.000 estimuladores de células en un pocillo de una placa de 96 pocillos y se desarrollaron por triplicado. Los cultivos se incubaron durante 6 días y a continuación se sometieron a pulso con Timidina tritiada durante 1 día y a continuación se cosecharon y se hizo su recuento usando un contador de centelleo beta. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 1.

Las células que responden se enumeran como números 1-21 en el eje X de la Figura 1. Los números 1-7 representan células AMP frente a células estimuladoras irradiadas (asterisco) mostradas en la leyenda. Los números 8-14 representan las células que Responden 1 frente a células estimuladoras irradiadas mostradas en la leyenda. Los números 15-21 representan las células que Responden 2 frente a células estimuladoras irradiadas mostradas en la leyenda.

Las PBMC normales no respondieron a ninguna de las células AMP estimuladoras irradiadas mostradas en la Figura 1. Las células que responden con falta de coincidencias de HLA-DR normales (1 y 2) solo presentaban una reacción positiva por MLR cuando se cultivaban entre sí. No hubo respuesta significativa de la célula que responde normal frente a las células AMP irradiadas ya sea en el punto de tiempo sin pasaje (P0), o cuando se cultivaban más tiempo después de pasaje (P1). La adición de citoquina proinflamatoria (IFN- $\gamma$  sola o IFN- $\gamma$ , IL-1 y TNF- $\alpha$ ) no aumentaba la respuesta de cualquiera de las células que responden normales con respecto a las células AMP, pero estas citoquinas pueden haber sido tóxicas al mismo tiempo. Estos datos sugieren que las células AMP no son capaces de generar una respuesta inmunitaria en el nivel de linfocitos T auxiliares.

### Ejemplo 3: Efectos inmunomoduladores de células AMP: Respuesta a Mitógenos. Reacción Linfocitaria Mixta, y una respuesta de memoria específica de antígeno a Citomegalovirus (CMV)

Las células PBMC normales responden de forma vigorosa a la estimulación con el mitógeno Concanavelina A (Con A) en un cultivo de tres días. Para evaluar los efectos inmunomoduladores de las células AMP en la estimulación Con A, se valoraron diversas concentraciones de células AMP en el ensayo. En resumen, las células PBMC se cultivaron a  $1 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos (BD Falcon, N.º de Cat. 08-772-5) en presencia de Con A  $10 \mu\text{M}$  (Sigma, N.º de Cat. C5275). Los cultivos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora humidificada con  $\text{CO}_2$  al 5 % durante 2 días, a continuación se sometieron a pulso durante una noche con  $1 \mu\text{Ci}$  de timidina tritiada ( $^3\text{H-dTR}$ , Perkin Elmer, Waltham, MA) para medir la proliferación de linfocitos T. A continuación, los cultivos se cosecharon usando un cosechador de células de 96 pocillos Mach III (Tomtec, Hamden, CT) y se hizo el recuento usando un contador de centelleo Microbeta (Wallac Inc., Gaithersburg, MD). Los resultados se expresaron como valores medios de cultivos por triplicado en recuentos por minuto (CPM) y se muestran en la Figura 2. Las células AMP se cocultivaron con las PBMC y mitógeno a diluciones a 1:4, 1:16 y 1:64. Los controles positivos consistían en PBMC más mitógeno solo. Los controles negativos consistían en PBMC solo y células AMP solas en medio de cultivo. Todos los cultivos se cosecharon y se hizo su recuento en el día 3. La inhibición de la proliferación de linfocitos T se determinó con el porcentaje de reducción en CPM de pocillos que contenían células AMP con respecto a la proliferación total de PBMC con respecto a Con A.

La MLR unidireccional se usó para evaluar la reactividad de los linfocitos T con respecto a la estimulación alogénica. Para identificar si las células AMP eran inmunogénicas con respecto a las PBMC alogénicas, las células PBMC que responden se cultivaron en  $200 \mu\text{l}$  de RPMI + 5% de suero AB humano a una concentración de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos junto con células AMP irradiadas con estimulador 2000 en la misma concentración por triplicado. Los cultivos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora humidificada con  $\text{CO}_2$  al 5 % durante 6 días, a continuación se sometieron a pulso durante 6 horas con  $1 \mu\text{Ci}$  de timidina tritiada para medir la proliferación de linfocitos T. Los resultados se expresaron como valores medios de cultivos por triplicado en recuentos por minuto (CPM) y se muestran en la Figura 2. Este experimento se repitió varias veces usando oraciones normales de células PBMC con alelos de DR de HLA con falta de coincidencias. El control positivo incluía cultivos de MLR entre dos PBMC con falta de coincidencias de HLA-DR. Los controles negativos consistían en células que responden y estimuladoras solas en RPMI + 5 % de suero AB y las que responden con respecto a sí mismas (irradiadas). Para evaluar las características inmunomoduladoras de las células AMP *in vitro*, las células AMP se valoraron en serie en una MLR entre las PBMC aisladas de voluntarios normales con alelos HLA-DR con falta de coincidencias. Las PBMC estimuladoras y las células AMP se irradiaron con 2000 rads para evitar la proliferación. Las células AMP se valoraron en la MLR a una concentración de partida de 1:4, y se diluyeron adicionalmente a 1:16 y 1:64. La proliferación de linfocitos T se midió como se ha descrito anteriormente. La inhibición de la proliferación de linfocitos T se determinó mediante el porcentaje de reducción en CPM de pocillos que contenían células AMP con respecto a la proliferación total entre células que responden normales y estimuladoras.

Los efectos inmunomoduladores de las células AMP en la respuesta de memoria de recuerdo de linfocitos T con respecto a antígeno de Citomegalovirus (CMV) también se sometieron a ensayo. Las PBMC seropositivas para CMV normales se aislaron como se ha descrito anteriormente y se cultivaron en presencia de antígeno de CMV soluble a  $1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 96 pocillos por triplicado. Las células AMP irradiadas con 2000 rad se valoraron en los pocillos de cultivo celular a una concentración de 1:4, y se diluyeron a 1:16 y 1:64. Estos cultivos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora humidificada con  $\text{CO}_2$  al 5 % durante 6 días, a continuación se sometieron a

pulso durante 6 horas con 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada para medir la proliferación de linfocitos T. Los resultados se expresaron como valores medios de cultivos por triplicado en recuentos por minuto y se muestran en la Figura 2. El control positivo consistía en las PBMC en presencia del antígeno de CMV solo. Los controles negativos consistían en las PBMC de respuesta y células AMP solas en medios de cultivo. La inhibición de la proliferación de linfocitos T se determinó mediante el porcentaje de reducción en CPM de pocillos que contenían células AMP con respecto a la proliferación total de PBMC con respecto al antígeno de CMV soluble.

Resultados: En ausencia de células AMP, los linfocitos T respondían de forma vigorosa a la estimulación con Con A, MLR alogénico, y al antígeno de CMV. Una inhibición significativa se produjo cuando las células AMP se valoraron en estos ensayos de una manera dependiente de la dosis ( $p < 0,01$ ). Este efecto de dosis fue más prevalente en el ensayo de antígeno de recuerdo, en el que los linfocitos T seropositivos se inhibieron en un promedio de un 95 % por células AMP valoradas en el ensayo a una dilución de 1:4. Los resultados eran reproducibles cuando se sometían a siete elementos de respuesta seropositivos para CMV frente al antígeno de CMV soluble en presencia de cuatro poblaciones diferentes de AMP. Este efecto también se observó en la MLR de alo-antígeno, en la que la inhibición media alcanzó un 80,1 % de inhibición. De nuevo, en estos ensayos se usaron siete diferentes conjuntos de elementos que responden y estimuladores con faltas de coincidencia con cuatro diferentes poblaciones de AMP. Por el contrario, la respuesta de Con A alcanzó solo un 51,6 % de inhibición en presencia de células AMP en esta dilución. Se sometieron a ensayo seis elementos que responden diferentes frente al mitógeno soluble con cuatro poblaciones diferentes de células de AMP. Estos efectos inhibitorios de células AMP no se vieron afectados por la adición o incubación previa de células AMP con IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  tampoco regulaba de forma positiva la expresión de la clase II del MHC con respecto a las células AMP en ningún momento, pero la expresión de HLA-G estaba regulada de forma positiva hasta aproximadamente un 60 % en la superficie de las células AMP (Figura 2). Como las células AMP se diluyeron adicionalmente a 1:16, aún se produjo una inhibición significativa dependiente de la dosis en los tres ensayos sometidos a ensayo, pero este efecto no estaba igualmente distribuido. La inhibición más elevada se observó con respuestas específicas para CMV a un promedio de un 62 %, mientras que el alo-antígeno y las respuestas a mitógeno disminuyeron hasta un promedio de inhibición de un 47 % y un 34 %, respectivamente. A la dilución final de las células AMP usada en estos ensayos (1:64), solamente la respuesta de recuerdo a CMV permanecía inhibida en más de un 50 %.

#### Ejemplo 4: Efectos de pasaje y respuesta a la dosis de células AMP en MLR de Alo-Antígeno

Las células AMP se aislaron a partir de diversos momentos cultivo y se hizo su pasaje. P0 es el punto temporal más inicial y se trata de células sin pasaje. P1, P2, y P3 se refieren a números de pasaje con P1 siendo células tomadas después del primer pasaje, P2 el segundo, y P3 el tercero. Después de la recogida, las células AMP se irradiaron y se colocaron en una MLR normal entre los elementos que responden 1 y 2 a  $1 \times 10^5$  de concentración de partida. A continuación, las células AMP se diluyeron en serie a partir de esta concentración de partida por debajo de 1:64 y se añadieron a la MLR para observar los efectos de los números de células menores en la inhibición. La Figura 3 muestra los resultados de este experimento.

La respuesta sin inhibir total entre elementos que responden normales 1 y 2 por MLR se muestra como números 1-4 en el eje X de la Figura 3. Los efectos inhibitorios de las valoraciones de células AMP, P0, P1, P2 y P3 se representan con los números 5-32 en el eje X.

Los resultados muestran una inhibición significativa de la MLR normal sin ningún impacto del tiempo de pasaje de las células AMP. La MLR se inhibió hasta un 89 % a la dilución de células AMP más elevada. Se observó un efecto de valoración, con inhibición de células AMP que permanecía sobre un 20 % incluso a la dilución de 1:64. En estas células AMP, la expresión de HLA-G se midió a ~52 % en el aislamiento o P0 y todavía se detectaba a P3 siendo (~12 %).

#### Ejemplo 5: Efectos de pasaje y respuesta a la dosis de células AMP sobre la respuesta de memoria a citomegalovirus (CMV)

Las características inmunomoduladoras de las células AMP también se evaluaron mediante un segundo experimento en el que las células AMP se irradiaron y se diluyeron en serie como se ha mencionado anteriormente, pero en lugar de cultivar en una MLR normal, las células se valoraron en una respuesta de memoria de antígeno de recuerdo para un ensayo de Citomegalovirus. El elemento que responde 2 es también un elemento que responde seropositivo para CMV. Cuando se cultiva con antígeno de CMV aislado, existe una alta respuesta tal como se mide mediante un índice de estimulación de la incorporación de  $H^3$  Timidina. Se trata de una respuesta de memoria clásica a un antígeno al que estos linajes celulares se expusieron previamente. Cuando las células AMP se valoraron en este sistema, se produjo una anulación de esta respuesta de memoria, como se muestra en la Figura 4.

La respuesta sin inhibir total entre el elemento que responde seropositivo y el antígeno de CMV se representa como números 1-4 en el eje X de la Figura 4. El efecto de las células AMP valoradas a P0, P1, P2, y P3 se representa con los números 5-32 en el eje X de la Figura 4.

La respuesta de CMV normal se inhibió en más de un 90 % usando las 3 primeras diluciones en serie de las células

AMP valoradas en el cultivo (1:1, 1:2 y 1:4). Esta inhibición disminuyó constantemente con otras valoraciones. No se produjo ningún efecto significativo del número de pasaje en los resultados de inclusión mostrados. Tomados en conjunto, estos datos ilustran que parece que las células AMP tienen una función inmunomoduladora y pueden regular de forma negativa la respuesta inmunitaria.

5

#### Ejemplo 6: El efecto inmunomodulador de las células AMP no es un efecto citotóxico

Para confirmar que el efecto observado es un efecto inmunomodulador de las células AMP y no un efecto citotóxico, se realizaron experimentos de cocultivo para evaluar el crecimiento y la viabilidad del elemento que responde. Los resultados de este experimento demuestran que los elementos que responden de PBMC cocultivados con células AMP tienen una viabilidad ligeramente inferior a los elementos que responden de PBMC solos. Los elementos que responden de PBMC a las PBMC alogénicas cultivadas con células AMP también presentaba una ligera disminución en la viabilidad. Sin embargo, los elementos que responden de PBMC con respecto a los elementos que responden de PBMC alogénicas sin células AMP también presentaban una cierta disminución de la viabilidad. Esta disminución de la viabilidad puede ser debida a una duración inadecuada del cultivo experimental.

10

15

#### Ejemplo 7 Efecto de las células AMP en el cultivo de células inducidas por factor de crecimiento: blastos de linfocitos T de IL-2 y linfocitos B transformados con virus de Epstein-Barr (EBV)

Las células AMP se analizaron para la inmunomodulación potencial de los cultivos de linfocitos T y B activados previamente. Se produjeron blastos de linfocitos T dependientes de IL-2 cultivando  $10 \times 10^6$  PBMC en presencia de Fitoheamaglutinina  $10 \mu\text{M}$  (PHA, Sigma N.º de Cat. L2646) y 10 U de rIL-2 (Peprotech, N.º de Cat. 200-02) durante un periodo de 5 días en 20 ml de RPMI + suero AB humano al 5 % en Matracas de cultivo tisular de  $25 \text{ cm}^2$  (BD Falcon, N.º de Cat. 08-772-18). A continuación, las células dependientes de IL-2 se recogieron por centrifugación y se lavaron una vez y se transfirieron a placas tratadas con cultivo tisular de 96 pocillos a una concentración de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en RPMI recién preparado + suero AB humano al 5 %. A continuación, las células se volvieron a exponer a IL-2 durante tres días y la proliferación se midió por absorción de  $^3\text{H-dTR}$  como se ha descrito anteriormente. Las células AMP se añadieron a estas células en este momento a una dilución de valoración de 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, y 1:1000 para evaluar los efectos inmunomoduladores. El control positivo consistía en blastos de linfocitos T en medio de cultivo en presencia de IL-2. Los controles negativos consistían en blastos de linfocitos T en medio de cultivo sin IL-2 y células AMP solo en medio de cultivo. La inhibición de la proliferación de blastos como respuesta a IL-2 se determinó mediante el porcentaje de reducción en CPM de los pocillos que contenían células AMP con respecto a la proliferación total de blastos de linfocitos T con respecto a IL-2.

20

25

30

35

40

45

Los blastos de linfocitos B transformados se crearon mediante cultivo de PBMC en presencia del virus de Epstein-Barr como se ha descrito anteriormente (Pope, J., Scott, W., Moss, D., Human lymphoid cell transformation by Epstein-Barr virus. National Review of Biology, 1973. 246: p. 140-141). Estos blastos activados previamente presentan una proliferación autosostenida cuando se cultivan en un medio que contiene suero fetal de ternera. Los blastos se cultivaron a  $1 \times 10^5$  células por pocillo en RPMI + suero fetal de ternera al 10 %. Las células AMP se añadieron a estas células en las mismas diluciones que se han mencionado anteriormente para evaluar los efectos sobre la proliferación de blastos de linfocitos B. El control positivo era blastos de linfocitos B en medio solo. Los controles negativos consistían en blastos de linfocitos B solos en medio sin suero fetal de ternera y células AMP solo en medio de cultivo. La inhibición de la proliferación de blastos de linfocitos B se determinó mediante el porcentaje de reducción en CPM de pocillos que contenían las AMP con respecto a la proliferación total de blastos de linfocitos B en medio con suero fetal de ternera.

Resultados: Los blastos de linfocitos T de IL-2 proliferaron como respuesta a la IL-2 exógena con un intervalo de CPM a 3560-12811. No se produjo inhibición de la proliferación de los blastos de linfocitos T para volver a exponerse a IL-2 usando cualquier dilución de células AMP sometidas a ensayo. De hecho, el rango de inhibición proliferativa fue CPM a 3472-12041, respectivamente ( $n = 3$ ). Estos resultados se repitieron de manera coherente con cualquier dilución de células AMP usadas, aunque la variabilidad era elevada debido a las grandes diferencias en la proliferación de los linfocitos T. se encontraron resultados similares cuando las células AMP se cocultivaban con blastos de linfocitos B en presencia de suero de ternera fetal en el medio de cultivo ( $n = 6$ ). Un ejemplo mostraba proliferación de linfocitos B en medio de cultivo solo a CPM a 1259. Después de la adición de células AMP a una proporción de 1:4 (la cantidad más elevada), no se produjo efecto inhibitorio con CPM restante a 1701. En ninguna dilución las células AMP inhibían la proliferación de blastos de linfocitos B con respecto a factores de crecimiento en medio de cultivo. Por lo tanto, había una falta total de inhibición dependiente de la dosis por las células AMP observada en las células activadas por factor de crecimiento.

50

55

60

#### Ejemplo 8: Ensayos de Transwell y medios condicionados

Las células AMP no irradiadas se colocaron en la cámara superior de placas de Transwell de 24 pocillos (Corning, tamaño de poro de  $4 \mu\text{m}$ , N.º de Cat. 3413) a una densidad confluyente de  $5 \times 10^5$  células AMP por pocillo. Se realizaron ensayos de estimulación de mitógenos en las cámaras inferiores consistentes en  $5 \times 10^5$  células PBMC aisladas de donantes normales y  $10 \mu\text{g/ml}$  de Concanavalina A. Después de 3 días en cultivo, las células de la cámara inferior se transfirieron a placas de fondo redondo de 96 pocillos por triplicado  $200 \mu\text{l/pocillo}$ ) y se sometieron

65

a pulso con  $^3\text{H-dTR}$  y se cosecharon 18 horas más tarde. Los grupos de comparación consistían en células PBMC normales más mitógeno solo, con células AMP valoradas en los pocillos a una dilución de 1:5, 1:50, y 1:500, con respecto a células AMP a las mismas valoraciones separadas de las PBMC y mitógeno por el aparato de membrana Transwell. Los datos se representan como porcentaje de proliferación (índice de proliferación), en el que los linfocitos T en presencia de estimulación con mitógeno solo eran iguales a un 100 %. La inhibición en el índice de proliferación se calculó restando el porcentaje de inhibición de cultivos en presencia de células AMP más estimulación a partir de cultivos solo con estimulación.

Los medios condicionados se retiraron de los cultivos de células AMP después de que el crecimiento alcanzara casi la confluencia en matraces de cultivo tisular T-75 (Fisher Scientific, N.º de Cat. 13-680-58). Los medios condicionados se añadieron de inmediato a los ensayos de mitógeno, MLR y de antígeno de recuerdo descritos anteriormente por dilución en serie produciendo diluciones finales de 1:2, 1:4 y 1:8 en cada experimento. Los controles positivos incluían PBMC más mitógeno solo, PBMC más alo-PBMC irradiadas solas, y PBMC más antígeno de CMV solo. Los anticuerpos negativos eran PBMC en medio de cultivo solo y PBMC en medios condicionados solos en cada dilución con medio de cultivo. Los datos se representan como porcentaje de proliferación (índice de proliferación), en el que los linfocitos T en presencia de estimulación con mitógeno por sí solo son iguales a un 100 %. La inhibición en el índice de proliferación se calculó restando el porcentaje de inhibición de cultivos en presencia de las AMP más estimulación a partir de cultivos con estimulación solo.

Resultados: En el sistema Transwell, las células AMP eran incapaces de suprimir las PBMC a partir de la proliferación como respuesta a mitógeno. La respuesta normal de las PBMC al mitógeno solo representa un índice de proliferación de un 100% (control). Como se ha mostrado anteriormente, las células AMP inhiben esta respuesta de una manera dependiente de la dosis. En este caso, las células AMP se valoraron en el ensayo a diluciones de 1:5, 1:50 y 1:500. Las células AMP redujeron el índice de estimulación de un 100 % hasta un promedio de un  $50 \pm 8,9\%$  a 1:5,  $56,7 \pm 7,4 \%$  a 1:50, y  $72 \pm 10,8 \%$  a 1:500. Cuando las células AMP se separaron de las PBMC y del mitógeno a través de los Transwell, no había inhibición en el índice de estimulación. De hecho, a la dilución de 1:5 de células AMP, el índice de proliferación en realidad aumentó en  $19,1 \pm 14,6$  por encima del control. A 1:50, se produjo una disminución de la proliferación hasta un  $90,1 \pm 12,1\%$  y a 1:500 se produjo un ligero aumento de un  $2,3 \pm 29,5\%$ . La razón por la cual las desviaciones estándar eran considerablemente más elevadas con los Transwells puede ser debido a las condiciones de ensayo usadas, dando como resultado cantidades desiguales de linfocitos T que responden que se transfieren entre las placas, contribuyendo de este modo a la amplia gama de CPM registradas. De cualquier modo, las células AMP aún eran incapaces de inhibir de forma significativa las respuestas de los linfocitos T a mitógeno. De hecho, los recuentos eran en realidad un poco más altos en dos de las tres diluciones examinadas (1:5 y 1: 500).

También se examinó el efecto inmunomodulador de los medios condicionados extraídos de células AMP en cultivo sobre mitógeno, alo-antigénico (MLR) y antígeno de recuerdo con respecto a ensayos de CMV. Los medios condicionados en la concentración más elevada (dilución 1:2) disminuían ligeramente la respuesta de las PBMC al mitógeno y presentaban una mayor inhibición a las respuestas de MLR y del antígeno de recuerdo, pero no alcanzaban una significación estadística debido a la alta variabilidad. No se produjo inhibición alguna en las diluciones de 1:4 y 1:8 sometidas a ensayo. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que las células AMP requieren contacto de célula a célula para provocar un efecto inmunomodulador y que este efecto no está mediado por factores solubles.



**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende una población de células progenitoras multipotentes derivadas del amnios no inmunogénicas (células AMP) que son células epiteliales que son positivas para la expresión de citoqueratinas y negativas para la expresión de CD34, en la que la población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales se prepara con el método de:
- (a) disociar células AMP que son células epiteliales de una membrana amniótica de un amnios aislado de una placenta;
  - (b) recoger las células AMP disociadas que son células epiteliales; y
  - (c) cultivar las células AMP recogidas que son células epiteliales en medio de cultivo que no contiene materiales derivados de animal distintos de proteínas humanas;
- en la que las células AMP no inmunogénicas son para su uso en la supresión, prevención o mejora de una respuesta inmunitaria en un sujeto que se podría beneficiar de la misma; y en la que la respuesta inmunitaria:
- (a) es una respuesta autoinmunitaria tal como diabetes de Tipo I, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Grave, anemia hemolítica autoinmune, penfigoide ampolloso, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, pénfigo o anemia perniciosa; o
  - (b) es una respuesta alogénica tal como enfermedad de injerto contra hospedador o enfermedad de hospedador contra injerto.
2. Una composición que comprende una población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales que son positivas para la expresión de citoqueratinas y negativas para la expresión de CD34, en la que la población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales se prepara con el método de:
- (a) disociar células AMP que son células epiteliales de una membrana amniótica de un amnios aislado de una placenta;
  - (b) recoger las células AMP disociadas que son células epiteliales; y
  - (c) cultivar las células AMP recogidas que son células epiteliales en medio de cultivo que no contiene materiales derivados de animal distintos de proteínas humanas
- para su uso en la supresión, prevención o mejora de una respuesta inflamatoria en un sujeto que se podría beneficiar de la misma; y en la que la respuesta inflamatoria es:
- (a) una enfermedad inflamatoria del sistema tegumentario tal como psoriasis o dermatitis atópica;
  - (b) una enfermedad inflamatoria del intestino tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn; o
  - (c) una enfermedad reumática tal como osteoartritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, fibromialgia, esclerodermia, espondiloartropatías, gota, artritis infecciosa, polimialgia reumática, polimiositis, artritis psoriásica, bursitis, tendinitis, Síndromes Periódicos Autoinflamatorios relacionados con *CIAS1* (CAPS), enfermedad inflamatoria pélvica, cistitis intersticial, púrpura de Henoh-Schonlein o síndrome de Behcet.
3. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el sujeto es un ser humano o un animal no humano.
4. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que:
- (a) la composición que comprende la población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales, se administra por vía tópica, por vía parenteral o por vía entérica, o
  - (b) la composición de una población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales que son positivas para la expresión de citoqueratinas y negativas para la expresión de CD34, se coadministra con uno o más agentes activos.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el uno o más agentes activos es corticosteroides, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, metotrexato, azatiopina, mercaptopurina, antibióticos citotóxicos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, interferón, opioides, proteínas de unión al TNF, micofenolato, FTY720 u otros tipos de células.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que los anticuerpos monoclonales son anticuerpos anti-receptores de linfocitos T (CD23) o anti-receptores de IL2 (CD25).
7. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que la población de células AMP no inmunogénicas que son células epiteliales que son positivas para la expresión de citoqueratinas y negativas para la expresión de CD34 es alogénica para el sujeto.

Figura 1

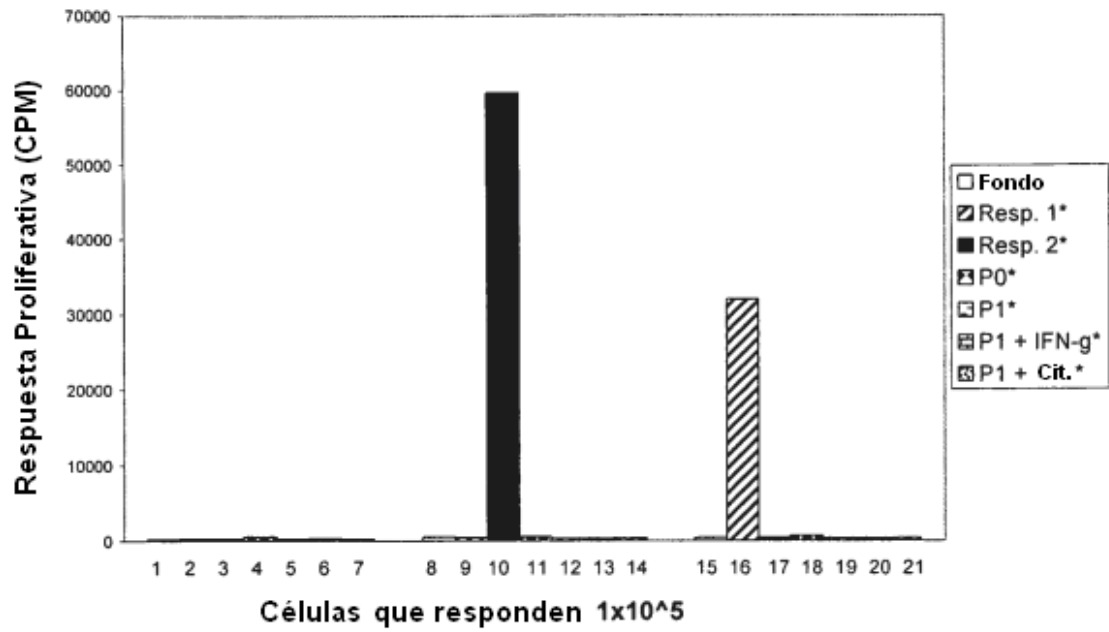


Figura 2

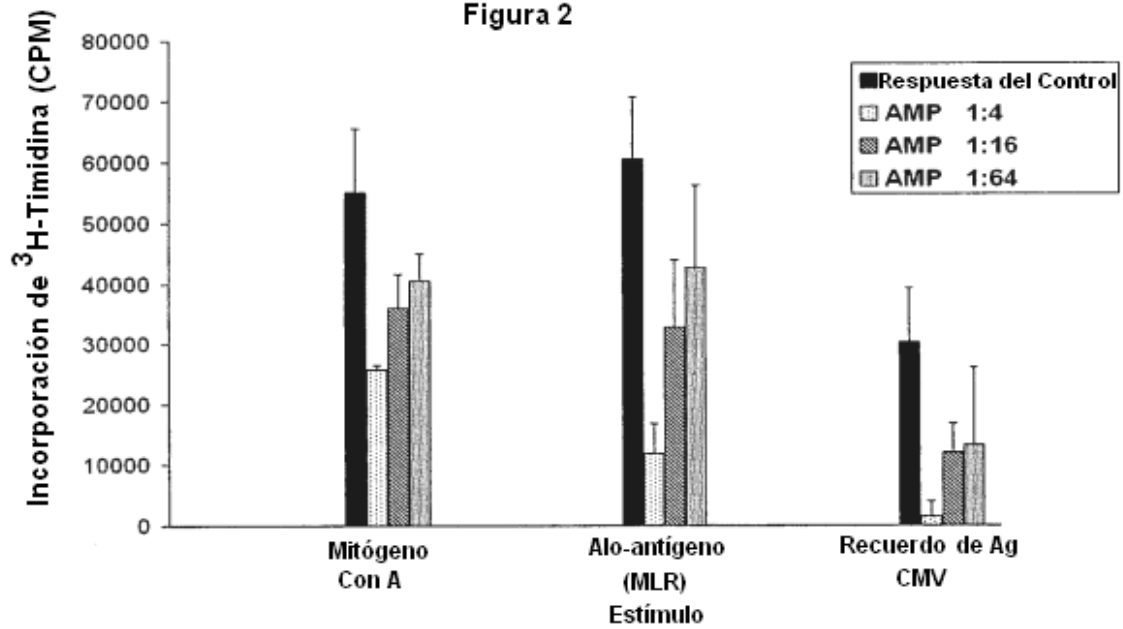


Figura 3

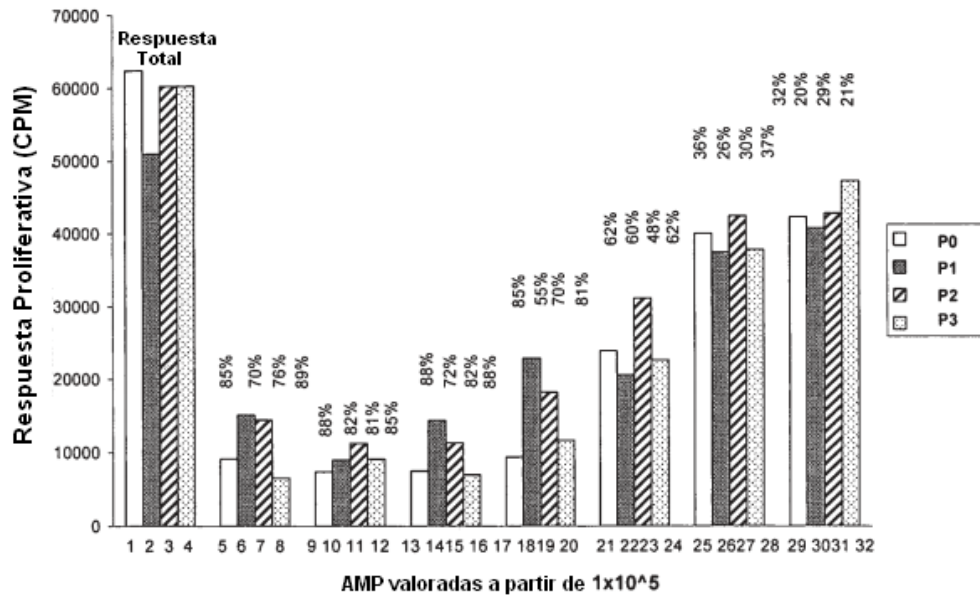


Figura 4

