

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 720**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| C12N 5/073 | (2010.01) |
| A61K 38/39 | (2006.01) |
| A61K 38/57 | (2006.01) |
| A61K 35/50 | (2015.01) |
| A01N 1/02 | (2006.01) |
| A61K 38/18 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2011 PCT/US2011/025493**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11103472**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2011 E 11745361 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2536827**

54 Título: **Métodos de fabricación de productos terapéuticos que comprenden dispersiones placentarias vitalizadas**

30 Prioridad:

30.07.2010 US 369562 P
18.02.2010 US 338489 P
18.02.2010 US 338464 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2018

73 Titular/es:

OSIRIS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
7015 Albert Einstein Drive
Columbia, MD 21046, US

72 Inventor/es:

JANSEN, TIMOTHY;
TOM, SAMSON;
DANILKOVITCH, ALLA;
YOO, DANA y
ZERHUSEN, JAIME

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 663 720 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de fabricación de productos terapéuticos que comprenden dispersiones placentarias vitalizadas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a productos placentarios, a productos placentarios para su uso en métodos de tratamiento médico, y a métodos para preparar productos placentarios.

Antecedentes

10 La integridad estructural del tejido se consigue, en parte, por una interacción dinámica del tejido con moléculas bioactivas, matriz extracelular, y una multitud de tipos de células circulantes. Dichas interacciones también son centrales durante el envejecimiento, lesión y tratamientos restauradores y regenerativos de los tejidos. Por ejemplo, las quemaduras producen lesión tisular local, así como consecuencias sistémicas. Actualmente, el tratamiento de heridas por quemaduras se centra en la estimulación de la cicatrización y disminución del riesgo de infección. Las heridas por quemaduras continúan siendo un problema frustrante y serio en la clínica, y estas heridas están frecuentemente acompañadas de altas tasas de morbilidad y mortalidad. El tratamiento de referencia para las quemaduras incluye el uso de antisépticos y apósitos de gasa para heridas. Sin embargo, para quemaduras graves y con gran área superficial, este tratamiento no es satisfactorio. El estándar de oro para el tratamiento de quemaduras graves continúa siendo los injertos autólogos de piel viva. Sin embargo, la cantidad de piel disponible para el injerto a menudo es extremadamente limitada, y este procedimiento siempre resulta en heridas en el sitio del donante.

20 Los intentos para mejorar el cuidado de las heridas por quemadura han incluido el uso de un único factor de crecimiento o una mezcla de factores de crecimiento, así como sustitutos biológicos de la piel. Los factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *epidermal growth factor*), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés *platelet derived growth factor*), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF, del inglés *fibroblast growth factor*), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*), y otros factores singulares, se han ensayado en la cicatrización de heridas por quemadura, sin embargo, con resultados variados.

30 El uso de membranas placentarias para quemaduras y otros tipos de heridas se originó hace más de 100 años (revisado por Kesting et al., 2008). Las membranas placentarias contienen componentes que están presentes en la piel y se requieren para la cicatrización de heridas, tales como matriz extracelular, factores de crecimiento, y células, incluyendo MSC (del inglés *mesenchymal stem cells*, células madre mesenquimales) que con responsables de orquestar el proceso de cicatrización de heridas. La eficacia de las membranas placentarias, tales como membranas amnióticas para quemaduras, se registró en diversos informes publicados; sin embargo, el uso de membranas placentarias para quemaduras con una gran área superficial está limitado debido a los retos de proporcionar membranas placentarias suficientes como para cubrir grandes áreas.

35 Lo que se necesita en la técnica en un producto terapéutico que proporcione los beneficios de las membranas placentarias y que pueda aplicarse en forma fluida. Además, es necesario un producto que proporcione terapia dinámica a lo largo de más de una, óptimamente todas, las fases de reparación de heridas: inflamatoria, proliferativa, y de remodelación.

Compendio de la invención

40 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para fabricar un producto placentario terapéutico que comprende: a) obtener células placentarias viables de un primer tejido placentario; b) retirar los trofoblastos del corion de un segundo tejido placentario que comprende corion y trofoblastos; c) después de la etapa b), disrupción del segundo tejido placentario para formar una dispersión placentaria en la que la dispersión placentaria comprende tejido de corion disrumpido, células viables y factores placentarios, en el que los factores placentarios se seleccionan del grupo que consiste en factores angiogénicos, quimioquinas, citoquinas, factores de crecimiento, proteasas, inhibidores de proteasas, y componentes de la matriz; y d) combinar las células placentarias y la dispersión placentaria para formar el producto placentario. En una realización del primer aspecto, el primer tejido placentario es autólogo respecto al segundo tejido placentario (por ejemplo, derivado del mismo donante). En una realización del primer aspecto, el segundo tejido placentario deriva del primer tejido placentario después de la etapa de obtener las células placentarias. En esta realización, la etapa de obtener las células placentarias puede comprender exponer el primer tejido placentario a una proteasa, en el que la proteasa es preferiblemente una colagenasa, en particular colagenasa II. En una realización, la etapa de exposición a la proteasa tiene una duración de aproximadamente 30 minutos o menor y preferiblemente libera menos de aproximadamente un 10 % del número máximo de células placentarias liberables. En una realización del primer aspecto, el primer tejido placentario y el segundo tejido placentario son un tejido amniótico o un tejido coriónico. En esta realización, la etapa de retirar trofoblastos puede comprender disección y tratamiento con dispasa. En una realización del primer aspecto, los factores placentarios comprenden dos o más factores placentarios mostrados en el grupo que consiste en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3, o Tabla 5. En una realización del primer aspecto, los factores placentarios comprenden dos o más

- factores placentarios mostrados en la Tabla 1 en una cantidad en el intervalo mostrado en la Tabla 1, mostrados en la Tabla 2 en una cantidad en el intervalo mostrado en la Tabla 2, o mostrados en la Tabla 5 en una cantidad en el intervalo mostrado en la Tabla 5. En una realización del primer aspecto, el producto placentario comprende uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en una proteína de la matriz extracelular; un inhibidor de proteasa; un factor angiogénico; y un factor placentario que estimula la migración de células epiteliales en una herida. En una realización del primer aspecto, los factores placentarios comprenden uno o más inhibidores de proteasa seleccionados del grupo que consiste en metaloproteinasas de matriz (TIMP), alfa-2 macroglobulinas y trombospondinas, uno o más factores angiogénicos seleccionados del grupo que consiste en VEGF y bFGF o uno o más factores que estimulan la migración de células epiteliales en una herida seleccionados del grupo que consiste en HGF y KGF. En una realización del primer aspecto, el producto placentario comprende uno o más inhibidores de proteasa seleccionados del grupo que consiste en metaloproteinasas de matriz (TIMP), alfa-2 macroglobulina y trombospondinas, uno o más factores angiogénicos seleccionados del grupo que consiste en VEGF y bFGF o uno o más factores que estimulan la migración de células epiteliales en una herida seleccionados del grupo que consiste en HGF y KGF. En una realización del primer aspecto, las células placentarias se seleccionan del grupo que consiste en células madre mesenquimales (MSC, del inglés *mesenchymal stem cells*), células estromales endometriales (ESC, del inglés *endometrial stromal cells*), células progenitoras mesenquimales derivadas de la placenta, células madre mesenquimales placentarias, fibroblastos, células epiteliales, células mesenquimales placentarias, macrófagos y células estromales. En esta realización, se prefiere que a) las células placentarias sean células estromales; b) las células placentarias se crioconserven, y c) la dispersión placentaria sea un homogenado. En una realización del primer aspecto, las células placentarias están presentes a una concentración de al menos aproximadamente 20.000 por ml de producto placentario. En una realización del primer aspecto, la dispersión placentaria es un homogenado. En una realización del primer aspecto, las células placentarias se crioconservan y preferiblemente las células placentarias se crioconservan antes de combinarlas con la dispersión placentaria. En una realización del primer aspecto, la dispersión placentaria se crioconserva.
- En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un producto placentario terapéutico que comprende células placentarias viables y una dispersión placentaria, en el que la dispersión placentaria (i) es una dispersión de corion que carece de componentes trofoblásticos y (ii) comprende tejido de corion disrumpido, células viables y factores placentarios, en el que los factores placentarios se seleccionan del grupo que consiste en factores angiogénicos, quimioquinas, citoquinas, factores de crecimiento, proteasas, inhibidores de proteasas y componentes de la matriz.
- En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un producto placentario terapéutico del segundo aspecto para su uso en un método para tratar una lesión tisular en un sujeto, en el que la lesión tisular es preferiblemente una quemadura o una herida. En una realización del tercer aspecto, el producto placentario terapéutico es autólogo respecto al sujeto.
- La presente invención proporciona métodos para fabricar productos placentarios que comprenden células placentarias y una dispersión placentaria que comprende factores placentarios. Las células placentarias y la dispersión placentaria derivan de tejido placentario, p. ej., una placenta completa o parte de ésta. El tejido placentario puede obtenerse por manipulación mecánica (p. ej., disección) o digestión enzimática o combinaciones de éstos. Un tejido placentario puede ser opcionalmente un amnios, corion, una mezcla de amnios y corion, u otro tejido descrito en la presente memoria.
- Opcionalmente, la dispersión placentaria es un homogenado.
- Opcionalmente, los factores placentarios presentes incluyen componentes de la matriz extracelular.
- Opcionalmente, la dispersión placentaria comprende uno o más factores placentarios mostrados en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3 o Tabla 5.
- Opcionalmente, las células placentarias comprenden células estromales tales como MSC (células madre mesenquimales) y PSC (del inglés *placental stem cells*, células madre placentarias).
- Opcionalmente, el primer tejido placentario se expone a una digestión limitada con una enzima tal como colagenasa II; p. ej., exposición durante menos de aproximadamente 1 hora (p. ej., aproximadamente 10 minutos o aproximadamente 20 minutos).
- Opcionalmente, el tejido placentario (a partir del que se produce la dispersión placentaria) es tejido coriónico empobrecido en trofoblastos por tratamiento con una enzima digestiva tal como dispasa II seguido de retirada física.
- Descripción breve de los dibujos**
- La Figura 1 representa la viabilidad celular, antes y después de un ciclo de congelación-descongelación de un producto placentario que comprende células aisladas y una dispersión placentaria.
- La Figura 2 representa la recuperación de células viables aisladas por digestión.

La Figura 3 representa la viabilidad celular, antes y después de un ciclo de congelación-descongelación de un producto placentario que comprende células aisladas y una dispersión placentaria.

La Figura 4 representa la recuperación de células viables aisladas por digestión.

5 La Figura 5 representa el nivel de células viables en un producto placentario preparado con o sin una etapa de aislamiento celular antes de la disrupción del tejido.

La Figura 6 representa el fenotipo celular de células en un producto placentario.

La Figura 7 representa la viabilidad celular usando varios crioprotectores.

La Figura 8 representa el peso del tejido placentario y células vivas recuperadas después de tratamiento con colagenasa de varios tiempos de incubación.

10 La Figura 9 representa el número de células liberadas por colagenasa de múltiples donantes.

La Figura 10 representa el nivel de células viables en un producto placentario cuando una placenta se somete a condiciones hipóxicas o normóxicas.

La Figura 11 representa la viabilidad celular cuando una placenta se somete a condiciones hipóxicas o normóxicas.

15 La Figura 12 representa la expresión de bFGF (A) y VEGF (B), respectivamente, en productos placentarios durante 14 días en cultivo.

La Figura 13 representa la expresión de IFN-2 α (A) y TGF- β 3 (B), respectivamente, en productos placentarios.

Figura 14: BMP-2, BMP-4, BMP-7, PLAB, PIGF (Figura 14 - A) e IGF-1 (Figura 14B) se detectaron en productos placentarios derivados de la membrana coriónica.

20 Figura 15: Imágenes representativas (Figura 15 - A y C) de células en subcultivo 2 aisladas y expandidas a partir de un producto placentario derivado de la membrana coriónica.

La Figura 16 representa la recuperación de células viables aisladas por digestión usando varias enzimas colagenasa II.

La Figura 17 representa la viabilidad celular, antes y después de un ciclo de congelación-descongelación de un producto placentario que comprende células aisladas y una dispersión placentaria.

25 **Descripción detallada de la invención**

Tal y como se usa en la presente memoria, se aplican las siguientes definiciones y abreviaturas.

"Tejido coriónico" o "Membrana coriónica" significa el corion o una parte de éste, p. ej., el trofoblasto, el mesodermo somático, o combinaciones de éstos.

"Ejemplar" (o "p. ej." o "por ejemplo") significa un ejemplo no limitante.

30 "Dispersión placentaria" significa un producto formado por disrupción física/mecánica de tejido placentario. Por ejemplo, una dispersión puede estar en la forma de un homogenado, una mezcla, una suspensión, un coloide, o una disolución.

35 "Tejido placentario" significa tejido derivado de la placenta en el sentido más amplio de la palabra. El tejido placentario puede ser una placenta completa o cualquier parte de ésta. Se pretende que "partes de la placenta" incluya corion, amnios, una membrana coriónica y amniótica (p. ej., amnios-corion), gelatina de Wharton, cordón umbilical, cotiledones placentarios o combinaciones de éstos. El tejido placentario puede diseccionarse o digerirse (o combinaciones de éstos) para retirar partes, membrana, o estructuras.

40 "Células placentarias" significa cualquier célula que puede obtenerse de una placenta, independientemente del origen genético (p. ej., maternal frente a fetal), origen de desarrollo (p. ej., endodérmico, ectodérmico o mesodérmico), o diferenciación. Las células placentarias pueden comprender cualesquiera células placentarias conocidas en la técnica, por ejemplo, células madre mesenquimales (MSC), células estromales endometriales (ESC), células progenitoras mesenquimales derivadas de la placenta, células madre mesenquimales placentarias, fibroblastos, células epiteliales, células mesenquimales placentarias, macrófagos, y semejantes.

45 "Células placentarias" se pretende que además requieran alguna característica de células vivas, tal como una o más de actividad metabólica, integridad estructural (p. ej., exclusión de una tinción de viabilidad tal como azul de metileno), actividad mitótica, transducción de señales, y semejantes.

"Factor placentario" significa cualquier producto que se puede obtener a partir de tejido placentario (o células placentarias). El producto puede ser un factor angiogénico, quimioquina, citoquina, factor de crecimiento, proteasa, inhibidor de proteasa, o componente de la matriz. Los factores placentarios ejemplares se listan en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 5.

- 5 "Lesión tisular" significa una lesión en cualquier tejido tal como la piel o la capa externa de cualquier órgano. Por lesión, se entiende una patología que implica o resulta de una agresión mecánica, metabólica u otra. Los ejemplos de dichas lesiones tisulares son quemaduras, heridas, ulceraciones, y laceraciones y ablaciones (incluyendo ablaciones con láser, congelación, criocirugía, por calor y eléctricas), e incisiones quirúrgicas.

Producto placentario

10 Visión de conjunto

Se ha descubierto sorprendentemente que un producto placentario puede producirse ahora combinando células placentarias y una dispersión placentaria para producir un producto medicinal con un valor terapéutico sustancial y superior cuando se administra a una lesión tisular. El producto placentario tiene varias propiedades ventajosas.

- 15 Fluidez. El producto placentario comparte determinadas propiedades de un fluido, tal como una capacidad de deformarse bajo un estrés aplicado y puede cuantificarse por mediciones de viscosidad. Así, el presente producto placentario puede extenderse sobre la superficie en la que se aplica. Por ejemplo, un ml de producto placentario puede extenderse por vía tópica para cubrir más de aproximadamente cualquiera de aproximadamente 1 cm², aproximadamente 10 cm², aproximadamente 25 cm², aproximadamente 50 cm² o aproximadamente 100 cm² de piel. Esta propiedad de fluidez resuelve el problema de aplicabilidad limitada de los productos que retienen las propiedades no elásticas de tejido (p. ej., injertos de piel). Además, la fluidez del presente producto placentario lo hace ahora práctico para nuevos usos, tales como la aplicación a articulaciones móviles y superficies curvadas. También proporciona un medio de aplicación rápida.

- 25 Liberación extendida. Las formulaciones de liberación extendida, especialmente para productos farmacéuticos tópicos, son especialmente problemáticas. Además, debido a las inestabilidades naturales, así como a la degradación metabólica, las formulaciones tópicas presentan frecuentemente una pérdida sustancial de actividad con el tiempo después de la administración. Sin limitarse a teoría alguna, los inventores creen que las células placentarias de los presentes productos placentarios producen componentes placentarios después de la administración. Así, los presentes productos placentarios pueden contener componentes placentarios derivados de la dispersión placentaria y derivados de las células placentarias y el empobrecimiento de los componentes placentarios puede reducirse. Adicionalmente, las células placentarias en el presente producto placentario pueden producir factores placentarios (p. ej., inhibidores de proteasas) que reducen la degradación metabólica de los factores placentarios.

- 35 Capacidad de respuesta dinámica. Sin limitarse a teoría alguna, los inventores creen que la presencia de células placentarias vivas proporciona al producto placentario la capacidad de responder a estímulos fisiológicos de una manera de alguna manera análoga a la de las células endógenas *in situ*. La evidencia de la capacidad de respuesta dinámica incluye la liberación estimulada de factores placentarios o cambios en el perfil de factores placentarios con el tiempo después de la administración.

Células placentarias

- 40 Las células placentarias pueden obtenerse de cualquier tejido placentario (p. ej., corion). Las células placentarias pueden obtenerse mediante el procesamiento de tejido placentario de cualquier manera que retenga la viabilidad celular de al menos un tipo celular (p. ej., MSC). Por ejemplo, las células placentarias pueden aislarse o purificarse de tejido placentario (p. ej., por digestión con colagenasa del corion) o pueden obtenerse sin aislamiento a partir de uno o más factores placentarios (p. ej., matriz extracelular) o a partir de otras células placentarias.

- 45 Las células placentarias pueden obtenerse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, Portmann-Lanz et al. ("Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration"; American Journal of Obstetrics and Gynecology (2006) 194, 664-73), ("Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes"; Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine 2007; 1: 296-305.) y ("Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells") describen métodos útiles para obtener células placentarias (p. ej., células coriónicas).

- 55 En una realización, las células placentarias se obtienen poniendo en contacto tejido placentario con una o más enzimas digestivas, por ejemplo, sumergiendo el tejido placentario (p. ej., corion, o tejido placentario que carece de trofoblastos) en una disolución que contiene la enzima digestiva. La enzima digestiva puede ser cualquier enzima digestiva conocida en la técnica. La enzima digestiva también puede ser una combinación de enzimas. Las enzimas digestivas ejemplares incluyen una o más: colagenasas (p. ej., colagenasa I, II, III y IV), metaloproteasas de matriz, proteasas neutras, papainas, desoxirribonucleasas, serina proteasas (p. ej., tripsina, quimiotripsina, elastasa), o

cualquier combinación de éstas.

En una realización, las células placentarias se obtienen de un corion poniendo en contacto un corion (p. ej., un corion que carece de trofoblastos) con una colagenasa (p. ej., colagenasa II). La colagenasa puede estar presente en cualquier concentración adecuada, por ejemplo, aproximadamente 100 U/mL a aproximadamente 1.000 mL, y en cualquier disolvente de colagenasa adecuado, tal como DMEM, y a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo, 37°C. El corion puede ponerse en contacto con la enzima digestiva durante cualquier periodo de tiempo adecuado. Opcionalmente, el corion se pone en contacto con una colagenasa (p. ej., colagenasa II) durante menos de aproximadamente cualquiera de: aproximadamente 3 h, aproximadamente 2 h, o aproximadamente 1 h. Opcionalmente, el corion se pone en contacto con la colagenasa (p. ej., colagenasa II) durante menos de aproximadamente 1 hora, por ejemplo, menos de aproximadamente cualquiera de: aproximadamente 60 min, aproximadamente 50 min, aproximadamente 40 min, aproximadamente 30 min, aproximadamente 20 min, aproximadamente 15 min, aproximadamente 10 min, o aproximadamente 5 min. Opcionalmente, el corion se pone en contacto con una colagenasa durante un periodo de tiempo limitado de manera que una parte sustancial del tejido placentario se retiene en un filtro de aproximadamente 100 micrómetros. Opcionalmente, el corion se pone en contacto con colagenasa II durante un periodo de tiempo limitado de manera que una parte sustancial del tejido placentario se retiene en un filtro de 100 micrómetros. Opcionalmente, después de obtener las células placentarias, el corion se disrumpe para formar una dispersión y la población se combina con (p. ej., se añade a) la dispersión.

Sorprendentemente, una etapa de obtención de células placentarias antes de someter el tejido placentario a disrupción de tejido resulta en un número sustancialmente mayor de células generalmente y también resulta en una población de células que se parece más a la población en el tejido placentario que una población de células que se obtiene de tejido placentario disrumpido.

Un producto placentario que comprende células placentarias de tejido placentario que no se ha disrumpido proporciona sorprendentemente una cantidad terapéuticamente efectiva de células viables sin la necesidad de la expansión *ex vivo* de las células placentarias. Aunque la expansión *ex vivo* es un método conocido para incrementar el número de células viables en una población, dicha etapa da lugar frecuentemente a cambios en la composición de la población o distribución de fenotipo celular. Por ejemplo, varias células en una población pueden expandirse a diferentes velocidades y la expansión también puede inducir diferenciación. De acuerdo con esto, una realización de la presente invención proporciona un producto placentario que comprende células placentarias derivadas de un tejido placentario en el que las células placentarias presentan una distribución fenotípica de células que es sustancialmente similar a la de las células del tejido placentario de origen.

Dispersión placentaria

Una dispersión placentaria puede proporcionarse mediante la disrupción de una placenta (p. ej., un corion). La disrupción del tejido placentario puede conseguirse por cualquier método físico/mecánico para disrumpir tejido (es decir, el uso de un "disruptivo de tejido" o "medio para la disrupción"). Por ejemplo, la disrupción puede comprender homogeneización, maceración, el uso de un mezclador, trituración o picado. La disrupción puede comprender adicionalmente o alternativamente, corte, picado, corte en dados o troceado. La disrupción puede comprender adicionalmente o alternativamente sonicación.

El tejido placentario puede disrumpirse durante cualquier duración adecuada que produzca una dispersión de la placenta. Por ejemplo, la placenta puede disrumpirse (p. ej., homogeneizarse) durante menos de aproximadamente 20 s, aproximadamente 15 s, aproximadamente 10 s, o aproximadamente 5 segundos.

El tejido placentario puede disrumpirse lo suficiente como para formar un producto placentario con características de fluidos y todavía retener células viables. De acuerdo con esto, las células vivas en los productos placentarios de la presente invención pueden comprender adicionalmente células placentarias que derivan de la dispersión placentaria.

El grado de disrupción de tejido puede reducirse por una etapa de digestión enzimática previa con una enzima que degrada la matriz, tal como una o unas colagenasas, una o unas proteasas, o combinaciones de éstas. De hecho, se ha descubierto sorprendentemente que dicha digestión previa preserva las células viables en la dispersión placentaria. Por ejemplo, la duración del tratamiento con un disruptivo de tejido puede reducirse por una digestión enzimática previa.

Factores placentarios

Un producto placentario de la presente invención comprende uno o más factores placentarios en los que los factores placentarios son componentes de la dispersión placentaria o componentes liberados en el producto placentario por las células placentarias o una combinación de éstos.

Se ha descubierto sorprendentemente que el contenido de factores placentarios en los productos placentarios preparados según la presente invención, tiene un valor terapéutico inesperado. Dicho contenido de factores placentarios, como se enseña en la presente memoria se refiere aquí consiguientemente como un "perfil terapéutico".

- 5 En una realización de la presente invención, un perfil terapéutico es uno que proporciona dos o más, o tres o más, o cuatro o más factores placentarios listados en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3 o Tabla 5. Opcionalmente, los factores placentarios están presentes en una cantidad de aproximadamente 20 % a aproximadamente 500 % de la concentración media mostrada en la Tabla 1, Tabla 2 o Tabla 5. Opcionalmente, los factores placentarios están presentes en una cantidad de aproximadamente 20 % a aproximadamente 500 % del mínimo y máximo (respectivamente) de los valores mostrados en la Tabla 1, Tabla 2 o Tabla 5.
- 10 Los factores placentarios, según la presente invención, pueden ser factores derivados de la placenta tales como factores angiogénicos, quimioquinas, citoquinas, factores de crecimiento, metaloproteasas de matriz, proteínas de la matriz extracelular (o "proteínas de la matriz"), y combinaciones de éstos. Los presentes productos placentarios pueden comprender cualquiera de estos factores placentarios.
- Los presentes productos placentarios pueden comprender opcionalmente un perfil terapéutico de uno o más de un PDGF (p. ej., PDGF-bb), EGF, FGF, TGF- β 1, TGF- β 3, y VEGF y/o uno o más de IL-8, IL-6 y MCP-1.
- Los productos placentarios útiles de la presente invención pueden tener un perfil terapéutico como se muestra en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3 o Tabla 5.
- 15 Los productos placentarios útiles de la presente invención pueden tener un perfil terapéutico que comprende al menos 25 % de la concentración mínima de uno o más factores placentarios mostrados en la Tabla 1 y opcionalmente no más de 400 % de la concentración máxima de uno o más factores placentarios mostrados en la Tabla 1. En una realización, el uno o más factores placentarios comprenden fibronectina, TIMP, TGF- β 1, bFGF y MMP (p. ej., MMP1, 2, 4, 7, 8, 9 y 10).
- 20 Los productos placentarios útiles de la presente invención pueden tener un perfil terapéutico que comprende cuatro o más factores placentarios en los que al menos dos factores placentarios son componentes de la matriz extracelular (o fragmento de ésta).
- Los productos placentarios de la presente invención pueden comprender un perfil terapéutico de uno o más factores placentarios que estimulan la migración de células epiteliales en un área de herida (p. ej., HGF y/o KGF), opcionalmente en combinación con un factor de crecimiento tal como TGF- β 1. Opcionalmente, la concentración de dichos factores placentarios es de aproximadamente 25 % de los valores mínimos mostrados en la Tabla 1 y opcionalmente no más de 400 % de la concentración máxima mostrada en la Tabla 1.
- 25 Los productos placentarios pueden comprender un perfil terapéutico de factores placentarios que son mitóticos o estimulantes del crecimiento. Los productos placentarios pueden contener HGF y KGF. Por ejemplo, HGF a una concentración de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 200.000 pg/mL y KGF a una concentración de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 400.000 pg/mL están presentes en un producto placentario ejemplar como se detalla en el Ejemplo 10. Opcionalmente, dichos productos placentarios son útiles para prevenir la formación de cicatrices o como una ayuda terapéutica durante la reepitelización.
- 30 Los productos placentarios de la presente invención pueden comprender un perfil terapéutico de factores placentarios que comprende uno o más factores angiogénicos (p. ej., VEGF y/o bFGF) y opcionalmente pueden comprender además uno o más factores de crecimiento (p. ej., TGF- β 1 y/o TGF- β 2).
- 35 Los productos placentarios ejemplares de la presente invención contienen un perfil terapéutico de niveles de VEGF mayor de aproximadamente 10 pg/ml o mayor de aproximadamente 50 pg/ml o mayor de aproximadamente 100 pg/ml. Por ejemplo, un producto placentario ejemplar puede comprender más de aproximadamente 200 pg/ml como se detalla en el Ejemplo 10.
- 40 Los productos placentarios ejemplares de la presente invención contienen un perfil terapéutico de niveles de bFGF mayor de cualquiera de aproximadamente 10 o 100 o 1.000 o 10.000 pg/ml. Un producto placentario ejemplar puede comprender más de aproximadamente 11.000 pg/ml, como se detalla en el Ejemplo 10. Opcionalmente, dichos productos placentarios que comprenden FGF son útiles para la cicatrización de heridas por quemadura.
- 45 Los productos placentarios de la presente invención pueden comprender un perfil terapéutico de TGF- β 1 y TGF- β 2. Un producto placentario ejemplar, como se detalla en el Ejemplo 10, comprende bFGF, TGF- β 1 y TGF- β 2. Opcionalmente, dichos productos placentarios son útiles cuando la patología de la piel que se está tratando implica una patología inflamatoria o de cicatrización.
- 50 Los productos placentarios de la presente invención pueden comprender un perfil terapéutico de uno o más inhibidores de proteasas, tal como inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz (TIMP), alfa-2 macroglobulina y/o trombospondinas.
- En una realización, un producto placentario (p. ej., derivado del corion) comprende uno o más inhibidores de proteasas.

En una realización, un producto placentario (p. ej., derivado del corion) comprende uno o más inhibidores de proteasas y proteínas de la matriz extracelular.

En una realización, un producto placentario (p. ej., derivado del corion) comprende uno o más inhibidores de proteasas y células viables.

- 5 En una realización, un producto placentario (p. ej., derivado del corion) comprende uno o más inhibidores de proteasas, proteínas de la matriz extracelular y células viables.

Sin limitarse a teoría alguna, los presentes inventores creen que la eficacia sorprendente que caracteriza a los productos placentarios de la presente invención produce una interacción entre las células placentarias y los factores placentarios que comprenden (1) factor(es) de crecimiento, (2) inhibidor(es) de proteasas y (3) componentes de la matriz extracelular. Los factores de crecimiento pueden unirse a la matriz extracelular protegiendo de esta manera a los factores de crecimiento frente a la degradación y prolongando eficazmente la semivida de los factores de crecimiento. La biodisponibilidad puede regularse además por la liberación posterior o degradación de la matriz. De forma similar, los inhibidores de proteasas en productos placentarios ejemplares proporcionan una protección adicional frente a la degradación por proteasas. Las células placentarias pueden proteger a los factores de crecimiento y a otros factores placentarios en los productos placentarios frente a la degradación proporcionando inhibidores de proteasas y factores de crecimiento adicionales. De acuerdo con esto, dichos productos placentarios pueden mantener opcionalmente una integridad del producto sorprendente durante periodos de tiempo prolongados dando como resultado productos placentarios que requieren aplicaciones menos frecuentes y un tratamiento superior de lesiones tisulares, tales como quemaduras y heridas. Sorprendentemente, los factores de crecimiento en dichos productos placentarios pueden demostrar una semivida más larga en comparación con otras terapias con factores de crecimiento tal como ACCS.

Formulación

Los productos placentarios de la presente invención se administran como un producto farmacéutico dermatológicamente aceptable. Opcionalmente, pueden añadirse ingredientes o excipientes farmacéuticos activos o combinaciones de éstos.

Viscosidad. Los valores de viscosidad que son útiles y deseables según la presente invención, varían en función de la indicación que se está tratando. Por ejemplo, cuando se desee una cobertura amplia (es decir, áreas grandes de la piel) o concentraciones menores de los productos placentarios, es ventajosa una formulación menos viscosa. Los ejemplos de formulaciones menos viscosas son los que tienen una viscosidad de aproximadamente 1.000 cps a aproximadamente 50.000 cps, o de aproximadamente 2.000 cps a aproximadamente 25.000 cps, o de aproximadamente 2.000 cps a aproximadamente 10.000 cps, o de aproximadamente 5.000 cps a aproximadamente 15.000 cps. Dichas composiciones menos viscosas facilitan la extensión de la composición aplicada.

Cuando se desean una cobertura más restringida o niveles mayores de los productos placentarios, es ventajosa una formulación más viscosa. Los ejemplos de formulaciones más viscosas son los que tienen una viscosidad de aproximadamente 20.000 cps a aproximadamente 200.000 cps o de aproximadamente 50.000 cps a aproximadamente 100.000 cps.

El experto en la técnica reconocerá fácilmente ahora que la viscosidad deseada puede lograrse según la presente invención mediante ajustes del método de dispersión (comentado en otro lugar de la presente memoria) o por selección de un agente espesante dermatológicamente aceptable y determinando empíricamente la concentración necesaria para conseguir el agente espesante deseado.

Los productos placentarios de la presente invención pueden incluir opcionalmente uno o más antibióticos, emolientes, agentes queratolíticos, humectantes, antioxidantes, conservantes, o combinaciones de éstos.

En una realización, un producto placentario comprende albúmina, tal como HSA o BSA. Opcionalmente, el producto placentario es una disolución de electrolitos, por ejemplo, para proporcionar osmolalidad y pH fisiológicos (p. ej., Plasma-LyteA). Opcionalmente, el producto placentario comprende un crioprotector, tal como DMSO, glicerol, sericina, azúcares, o una mezcla de éstos.

En una realización, un producto placentario comprende albúmina, una disolución de electrolitos y un crioprotector. Opcionalmente, el producto terapéutico comprende de un 1 % a aproximadamente un 15 % en peso de albúmina y de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % en volumen de crioprotector (p. ej., aproximadamente un 10 %). Opcionalmente, la albúmina es HSA, la disolución de electrolitos es Plasma-Lyte A y el crioprotector es DMSO.

Fabricación

Visión de conjunto

5 Un producto placentario de la presente invención puede fabricarse a partir de una placenta de cualquier manera adecuada que proporcione las características técnicas enseñadas en la presente memoria. Cualquier tejido placentario es útil según la presente invención. Se pretende que cada una de las realizaciones de la presente invención mostradas en la presente memoria englobe específicamente productos placentarios en los que la dispersión placentaria sea una dispersión de corion que esté empobrecida en o que carezca de componentes trofoblásticos.

Según la presente invención, la placenta se procesa para producir la dispersión placentaria y las células placentarias.

En una realización, la dispersión placentaria y las células placentarias derivan de una placenta diferente o de una parte placentaria diferente (p. ej., procesamiento paralelo).

10 En una realización, la dispersión placentaria y las células placentarias derivan de la misma placenta o de la misma parte placentaria (p. ej., procesamiento secuencial).

Método de Fabricación 1. En una realización, un producto placentario se fabrica mediante:

obtención de un tejido placentario (p. ej., coriónico);

15 digestión del tejido placentario con una o más enzimas de degradación de la matriz (p. ej., una colagenasa, opcionalmente colagenasa II);

obtención de células placentarias del tejido placentario digerido;

disrupción del tejido placentario digerido con un disruptivo tisular para formar una dispersión placentaria que comprende factores placentarios; y

combinación de las células placentarias y la dispersión placentaria para formar el producto placentario.

20 Método de Fabricación 2 Opcional. En una realización, un producto placentario se fabrica mediante:

obtención de un primer tejido placentario (p. ej., coriónico);

digestión del primer tejido placentario con una o más enzimas de degradación de la matriz (p. ej., una colagenasa, opcionalmente colagenasa II);

obtención de células placentarias del primer tejido placentario digerido;

25 obtención de un segundo tejido placentario;

disrupción del segundo tejido placentario con un disruptivo tisular para formar una dispersión placentaria que comprende factores placentarios; y

combinación de las células placentarias y la dispersión placentaria para formar el producto placentario.

30 Para cualquiera de los dos Métodos de Fabricación, el tejido placentario puede ser un tejido de corion, tal como un tejido de corion que se ha procesado para reducir el número de células trofoblásticas.

Los productos placentarios ejemplares de la presente invención pueden fabricarse o proporcionarse con una venda o apósito para heridas.

Eliminación de trofoblastos

35 Los trofoblastos se empobrecen o retiran para producir el tejido placentario a partir del cual deriva al menos la dispersión placentaria. Sorprendentemente, dicho producto placentario tiene una o más de las siguientes características superiores:

a. es sustancialmente no inmunogénico;

b. proporciona un tiempo de curación destacable; y

c. proporciona eficacia terapéutica potenciada.

40 Los trofoblastos pueden retirarse de cualquier manera adecuada que disminuya sustancialmente el contenido de trofoblastos del producto placentario. Opcionalmente, los trofoblastos se retiran de forma selectiva o se retiran de otro modo sin eliminar una parte sustancial de uno o más componentes terapéuticos de la placenta (p. ej., MSC, factores placentarios, etc.). Opcionalmente, los trofoblastos se retiran antes de aislar una población de células y/o disrumpir el tejido placentario.

Un método de retirada de trofoblastos comprende tratar la placenta (p. ej., corion o amnios-corion) con una enzima digestiva, tal como dispasa (p. ej., dispasa II) y separar los trofoblastos de la placenta. Opcionalmente, la etapa de separación comprende la separación mecánica tal como raspado. Opcionalmente, el raspado comprende el raspado con un instrumento suave tal como un dedo.

- 5 Portmann-Lanz et al. ("Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration"; American Journal of Obstetrics and Gynecology (2006) 194, 664-73), ("Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes"; Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine 2007; 1: 296-305.), y ("Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells") describen métodos
10 útiles de retirada de trofoblastos de una placenta (p. ej., corion).

Conservación

Un producto placentario de la presente invención puede usarse fresco o puede conservarse durante un periodo de tiempo.

- 15 También, como se representa en la Figura 1, para un producto placentario de la presente invención, la viabilidad celular se retiene sorprendentemente bien después de un ciclo de congelación-descongelación.

En una realización, un producto placentario está crioconservado. Un producto placentario puede crioconservarse por congelación (p. ej., a -80 °C). La congelación puede comprender almacenamiento en un medio de crioconservación tal como DMSO, glicerol, sericina, azúcares, o mezclas de éstos. La congelación puede comprender, por ejemplo, incubar el producto placentario a 4 °C durante 30-60 min, y después incubar a -80 °C hasta su uso. El producto
20 placentario después puede descongelarse para su uso.

Un producto placentario puede formularse en un crioconservante antes de la crioconservación. Los crioconservantes ejemplares incluyen DMSO, glicerol, y semejantes. El crioconservante puede formularse además con componentes adicionales tales como albúmina (por ejemplo, HSA o BSA), una disolución de electrolitos (por ejemplo, Plasma-Lyte) o una combinación de las mismas. Opcionalmente, el producto placentario comprende de un 1 % a
25 aproximadamente un 15 % en peso de albúmina y de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % en volumen de crioconservante (p. ej., aproximadamente un 10 %).

Opcionalmente, un producto placentario de la presente invención puede formarse por la adición de células placentarias crioconservadas como se describe en la presente memoria a una dispersión placentaria fresca (nunca congelada) o a una dispersión placentaria congelada o a una dispersión placentaria liofilizada.

- 30 Opcionalmente, un producto placentario de la presente invención puede formarse por la adición de células placentarias frescas como se describe en la presente memoria a una dispersión placentaria congelada o a una dispersión placentaria liofilizada.

Métodos de uso

- 35 Los productos placentarios de la presente invención pueden usarse para tratar cualquier lesión tisular. El producto placentario de la presente invención puede usarse en un método de tratamiento, por ejemplo, administrando el producto placentario a un sujeto que lo necesite.

Un método de administración típico de los productos placentarios de la presente invención es la administración tópica. La administración puede implicar opcionalmente la administración a un tejido interno donde se obtiene acceso por un procedimiento quirúrgico.

- 40 Los productos placentarios pueden administrarse de forma autóloga, alogénica o xenogénica.

En una realización, un presente producto placentario se administra a un sujeto para tratar una herida. Opcionalmente, la herida es una laceración, raspadura, quemadura térmica o química, incisión, perforación o herida causada por un proyectil. Opcionalmente, la herida es una herida de la epidermis, herida de la piel, herida crónica, herida aguda, herida externa, heridas internas, herida congénita, úlcera o úlcera por presión. Dichas heridas pueden
45 ser accidentales o deliberadas, por ejemplo, heridas causadas durante o asociadas a un procedimiento quirúrgico. Opcionalmente, la herida se cierra quirúrgicamente antes de la administración.

En una realización, la lesión es una quemadura. Opcionalmente, la quemadura es una quemadura de primer grado, de segundo grado (quemaduras de grosor parcial), de tercer grado (quemaduras de grosor total), infección de una herida por quemadura, infección de una herida por quemadura extirpada y no extirpada, pérdida de epitelio de una quemadura con un injerto previo o curada, o impétigo de herida por quemadura.

- 50 En una realización, la lesión es una úlcera, por ejemplo, una úlcera diabética (p. ej., úlcera en el pie).

En una realización, un producto placentario se administra colocando el producto placentario directamente sobre la

piel del sujeto, por ejemplo, en el estrato córneo, en el sitio de la herida, de modo que la herida se cubre, por ejemplo, usando una cinta adhesiva. Además, o como alternativa, el producto placentario puede administrarse como un implante, por ejemplo, como un implante subcutáneo.

5 En una realización, un producto placentario se administra a la epidermis para reducir las arrugas u otras características de la piel envejecida. Dicho tratamiento también se combina de forma útil con la denominada cirugía estética (p. ej., rinoplastia, ritidectomía, etc.).

10 En una realización, un producto placentario se administra a la epidermis para acelerar la curación asociada con un procedimiento de ablación dérmica o un procedimiento de abrasión dérmica (p. ej., incluyendo ablación con láser, ablación térmica, ablación eléctrica, ablación dérmica profunda, ablación subdérmica, ablación fraccionada y abrasión microdérmica).

Otras patologías que pueden tratarse con los productos placentarios de la presente invención incluyen heridas traumáticas (p. ej., heridas causadas a civiles y militares), cicatrices y heridas quirúrgicas, fusiones vertebrales, lesiones de la médula espinal, necrosis avascular, cirugías de reconstrucción, ablaciones e isquemia.

15 En una realización, un producto placentario de la presente invención se usa en un procedimiento de injerto de tejido. Opcionalmente, el producto placentario se aplica a una parte del injerto que después se adhiere a un sustrato biológico (p. ej., para promover la curación y/o la adhesión al sustrato). A modo de ejemplo no limitante, tejidos tales como piel, cartílago, ligamento, tendón, periostio, pericondrio, cápsula sinovial, fascia, mesenterio y fibra pueden usarse como injerto tisular.

20 En una realización, un producto placentario se usa en una cirugía de tendón o ligamento para promover la curación de un tendón o ligamento. Opcionalmente, el producto placentario se aplica a parte de un tendón o ligamento que está adherido a un hueso. La cirugía puede ser cualquier cirugía de tendón o ligamento incluyendo, p. ej., cirugía de rodilla, hombro, cirugía de pierna, cirugía de brazo, cirugía de codo, cirugía de dedo, cirugía de mano, cirugía de muñeca, cirugía de dedo del pie, cirugía de pie, cirugía de tobillo y similares. Por ejemplo, el producto placentario puede aplicarse a un tendón o ligamento en un procedimiento de injerto o reconstrucción para promover la fijación
25 del tendón o ligamento a un hueso.

A través de la percepción de los inventores, se ha descubierto sorprendentemente que los productos placentarios de la presente invención proporcionan un tratamiento superior (p. ej., tiempo de curación y/o fuerza curativa) para cirugías de tendón y ligamento. Las cirugías de tendón y ligamento pueden implicar la fijación del tendón o ligamento al hueso. Sin limitarse a teoría alguna, los presentes inventores creen que el potencial osteógeno y/o condrógeno de las MSC en los presentes productos placentarios promueve el proceso de curación y la fuerza curativa de tendones o ligamentos. Los presentes inventores creen que los presentes productos placentarios proporcionan un tratamiento alternativo o auxiliar para terapias basadas en periostio. Por ejemplo, los tratamientos basados en periostio útiles se describen en Chen et al. ("Enveloping the tendon graft with periosteum to enhance tendon-bone healing in a bone tunnel: A biomechanical and histologic study in rabbits"; Arthroscopy 2003 Mar; 19(3):290-6), Chen et al.
30 ("Enveloping of periosteum on the hamstring tendon graft in anterior cruciate ligament reconstruction"; Arthroscopy 2002 Mayo-Junio; 18(5):27E), Chang et al. ("Rotator cuff repair with periosteum for enhancing tendon-bone healing: a biomechanical and histological study in rabbits"; Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy Volumen 17, Número 12, 1447-1453).

40 Como ejemplo no limitante de un método de cirugía de tendón o ligamento, un tendón se sutura a y/o se enrolla o envuelve en una membrana placentaria y el tendón se adhiere a un hueso. Opcionalmente, el tendón se coloca en un túnel óseo antes de adherirlo al hueso.

En una realización, la cirugía de tendón o ligamento es un procedimiento de injerto, en donde el producto placentario se aplica al injerto. Opcionalmente, el injerto es un aloinjerto, xenoinjerto o un injerto autólogo.

45 En una realización, la cirugía de tendón o ligamento es la reparación de un ligamento o tendón desgarrado, en donde el producto placentario se aplica al ligamento o tendón desgarrado.

Los ejemplos no limitantes de tendones a los que puede aplicarse un producto placentario incluyen un tendón del extensor de los dedos, un tendón isquiotibial, un tendón del bíceps, un tendón de Aquiles, un tendón del extensor y un tendón del mancueto rotador.

50 En una realización, un producto placentario de la presente invención se usa para reducir la fibrosis aplicando el producto placentario a un sitio de herida.

En una realización, un producto placentario de la presente invención se usa como barrera antiadhesión de una herida, en donde el producto placentario se aplica a un sitio de herida, por ejemplo, para reducir la fibrosis (p. ej., fibrosis postoperatoria).

Los ejemplos no limitantes de sitios de herida a los que el producto placentario puede aplicarse incluyen aquellos

que se inducen quirúrgicamente o están asociados con cirugía que implica la columna vertebral, laminectomía, rodilla, hombro o heridas o lesiones relacionadas con el parto, traumatismos, procedimientos cardiovasculares, estimulación de angiogénesis, procedimientos cerebrales/neurológicos, cuidado de quemaduras y heridas, y procedimientos oftálmicos. Por ejemplo, opcionalmente, el sitio de la herida está asociado con cirugía de la columna vertebral y el lado estromal del producto placentario se aplica a la duramadre (p. ej., el lado estromal orientado a la duramadre). Por ejemplo, en los documentos WO 2009/132186 y US 2010/0098743 pueden encontrarse instrucciones de dichos procedimientos, incluyendo la selección de sitios de herida y/o metodologías.

Un producto placentario de la presente invención puede usarse opcionalmente para reducir la adhesión o fibrosis de una herida. La fibrosis postoperatoria es una consecuencia natural de la curación de todas las heridas quirúrgicas. Por ejemplo, la adhesión peridural postoperatoria provoca inmovilización, tracción y compresión del saco tecal y las raíces nerviosas, que causa una reparación de hiperestesia que típicamente se manifiesta unos pocos meses después de la cirugía de laminectomía. La cirugía repetida para la eliminación de tejido cicatricial está asociada con un mal resultado y un riesgo aumentado de lesión a causa de la dificultad de identificar las estructuras neurales que están rodeadas por tejido cicatricial. Por lo tanto, los estudios experimentales y clínicos se han centrado principalmente en la prevención de la adhesión del tejido cicatricial a la duramadre y las raíces nerviosas. Las adhesiones vertebrales se han implicado como un factor de contribución principal en el fracaso de cirugía vertebral. El tejido cicatricial fibrótico puede causar compresión e inmovilización de las raíces nerviosas, que pueden asociarse con dolor recidivante y deterioro físico.

Los productos placentarios desvelados en la presente memoria son útiles en el tratamiento de diversas heridas, incluyendo: reparación de tendones, reparación de cartílagos (p. ej., cóndilo femoral, meseta tibial), remplazo de ACL en la superficie de contacto del túnel/hueso, aumento de tejido dental, fistulas (p. ej., enfermedad de Crohn, sonda G, traqueoesofágica), pérdida de tejido en las barreras de adhesión (p. ej., reparación del tabique nasal, reparación de la pared vaginal, reparación de la pared abdominal, resección de un tumor), heridas de la dermis (p. ej., quemaduras de grosor parcial, necrólisis epidérmica tóxica, epidermolísis ampollosa, piodermia gangrenosa, úlceras, p. ej., úlceras diabéticas (p. ej., en el pie), úlceras varicosas en las piernas), heridas quirúrgicas, reparación de hernias, reparación de tendones, reparación de la vejiga, remplazo del periostio, queloides, laceraciones en los órganos, defectos epiteliales y reparación o remplazo de una membrana timpánica.

La tecnología descrita presentemente y sus ventajas se entenderán mejor por referencia a los ejemplos siguientes. Estos ejemplos se proporcionan para describir realizaciones específicas de la presente tecnología. Al proporcionar estos ejemplos específicos, no se pretende limitar el alcance de la presente tecnología.

En la presente memoria descriptiva, el uso del singular incluye el plural excepto cuando se indique específicamente.

Ejemplos

Ejemplo 1 Obtención de Tejido Placentario

Se obtuvo una placenta completa de un banco de tejidos registrado después de obtener el consentimiento informado. La placenta se puso, con la superficie maternal (superficie rugosa) hacia abajo, en una bandeja estéril. La membrana amniótica-coriónica se cortó y retiró de la placenta. Después, la membrana coriónica se separó del amnios y se lavó dos veces en PBS.

Después, la membrana coriónica se sumergió en una disolución de anticoagulante (ACD-A) para retirar los coágulos sanguíneos y se lavó de nuevo en PBS.

Después, la membrana coriónica se digirió por incubación con dispasa II durante 30 min a 37 °C. La capa de trofoblastos se retiró mecánicamente raspando con los dedos y el corion se lavó de nuevo en PBS.

La membrana coriónica se incubó después durante 24 horas en una mezcla de antibióticos que contenía gentamicina, vancomicina y anfotericina B, y se lavó de nuevo en PBS.

Ejemplo 2 Digestión de Tejido Placentario

Una membrana coriónica (obtenida del Ejemplo 1) se digirió por incubación en 200 mL de una disolución de colagenasa II (300 U/mL en DMEM) durante 10 min a 37 °C. Después, la membrana coriónica se retiró, dejando una suspensión de digestión que contenía colagenasa y células placentarias.

El volumen y contenedor para la digestión se determinó sobre la base de la necesidad de proporcionar un entorno adecuado para la digestión del tejido una vez colocado en un agitador. La digestión se llevó a cabo en un agitador de placa estándar ajustado a una velocidad moderada en una incubadora de cultivo celular a 37 °C.

Ejemplo 3 Obtención de Células Placentarias

Una suspensión de digestión, que comprende células placentarias (obtenida del Ejemplo 2), se centrifugó a 2.000 rcf durante 5 min para separar la enzima digestiva (colagenasa II) de las células placentarias. Esta etapa de

centrifugación puede potenciar la viabilidad celular mediante la prevención de sobre-digestión y asegurar que la enzima se elimina por lavado antes de homogeneizar el tejido. Esta etapa de centrifugación sedimenta las células sin dañarlas, permitiendo eliminar la colagenasa II como sobrenadante.

- 5 Después, las células se centrifugaron de nuevo, el sobrenadante se eliminó por vertido, y las células placentarias se resuspendieron en un pequeño volumen (2 mL) de crioprotector (DMSO al 5 % en disolución salina). Dos mL proporcionan un volumen adecuado para resuspender las células mientras no se diluye demasiado la dispersión de membrana coriónica una vez se han añadido las células.

Ejemplo 4 Obtención de una Dispersión Placentaria

- 10 Una membrana coriónica (obtenida del Ejemplo 2) se lavó dos veces en PBS para retirar la enzima de digestión residual y se puso en un contenedor de homogeneización con 1 ml de crioprotector por gramo de membrana coriónica. Se determinó que este volumen era apropiado para diluir la membrana coriónica lo suficiente como para producir una dispersión de consistencia ideal mientras se mantenía la concentración de proteínas a niveles clínicamente significativos.

- 15 La temperatura de la membrana coriónica se redujo poniendo el contenedor en hielo durante más de 10 min. Después, la membrana coriónica se homogeneizó dos veces a alta velocidad durante 5 s usando un homogeneizador de tejidos para obtener una dispersión coriónica (homogenado).

Una vez que la membrana coriónica se ha sometido a digestión, resulta fácil de homogeneizar. Sorprendentemente, sólo es necesaria una pequeña cantidad de homogeneización para crear una disolución homogénea ideal para uso clínico e incrementa la cantidad de células vivas presentes en la dispersión final.

20 **Ejemplo 5 Suministro de un Producto Placentario**

Una dispersión placentaria (obtenida del Ejemplo 4) se combinó con células placentarias aisladas viables (obtenidas del Ejemplo 3) y se mezclaron concienzudamente para proporcionar un producto placentario. El producto placentario puede usarse (p. ej., para terapia) fresco o puede conservarse primero (p. ej., criogénicamente) durante un periodo de tiempo.

25 **Ejemplo 6 Crioconservación**

Un producto placentario (obtenido del Ejemplo 5) se dividió en viales en partes alícuotas y se incubó a 4 °C durante 30-60 min. Después, los viales se congelaron a -80 °C hasta su uso.

Ejemplo 7 Aislamiento de Células sin Digestión Completa de la Placenta

- 30 Los inventores ensayaron si para obtener una suspensión que contuviese células vivas y al mismo tiempo conservar la integridad del tejido placentario (p. ej., conservar los factores placentarios y las células vivas restantes) podría realizarse una digestión limitada con colagenasa II. Una digestión breve de 10 minutos con colagenasa II dejó el tejido intacto y permitió además su manipulación. Además, una digestión de 10 min con colagenasa fue capaz de producir una gran cantidad de células viables.

- 35 Se obtuvieron dos placentas, cada una de un donante diferente, y se procesaron según el procedimiento detallado en los Ejemplos 1 y 2, excepto a una concentración de colagenasa II de 244 U/mL, como se ha descrito anteriormente. Se realizó un recuento celular inmediatamente después de la digestión para determinar el número de células viables por gramo de tejido que cada enzima fue capaz de retirar del tejido por digestión. Los datos se presentan en la Figura 2.

- 40 Las placentas se procesaron adicionalmente como se describe en los Ejemplos 3 a 6. Antes de congelar y después de descongelar, las células se contaron usando un hemocitómetro y se usó tinción con azul de tripán para distinguir las células vivas. Los datos se presentan en la Figura 3.

- 45 Sorprendentemente, se aisló una población sustancial de células por digestión de menos de 1 h (p. ej., 10 min). La digestión del tejido durante sólo 10 min permitió que las células se soltaran y retiraran del tejido sin degradarlo completamente. De esta manera, fue posible separar la mezcla de colagenasa II/células de la membrana coriónica. Los inventores descubrieron que 10 min era una cantidad adecuada de tiempo de digestión y permitía variaciones introducidas como un resultado de la variabilidad de los donantes. El proceso de digestión permite el aislamiento de tantas células vivas como es posible mientras no se disrumpe la integridad del tejido de la membrana coriónica hasta un grado que hace imposible una manipulación adicional. La membrana coriónica podría disrumperse entonces para producir una dispersión placentaria que fuera rica en factores placentarios mientras las células podrían aislarse de la disolución enzimática y después reintroducirse en la dispersión para formar el producto placentario.

Ejemplo 8 Aislamiento de Células sin Digestión Completa del Tejido Placentario

Se prepararon múltiples productos placentarios y se tomaron recuentos celulares inmediatamente después de la

digestión (Figura 4) y antes de la congelación y después de la descongelación (Figura 1), usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 7. Las células se contaron usando un hemocitómetro y se usó tinción con azul de tripán para distinguir las células vivas. Todos los datos de recuento celular se combinaron y se calculó una media.

5 Como se representa en la Figura 4, la digestión de una membrana intacta, como se enseña en la presente memoria, produce un número de células sorprendente, y lo hace sin disrupción mecánica de la membrana. Como también se representa en la Figura 4, la digestión de una membrana, como se enseña en la presente memoria, produce una relación sorprendentemente alta de células viables con respecto a no viables.

10 Como se representa en la Figura 1, un producto placentario fresco de la presente invención comprende sorprendentemente una alta viabilidad celular. Como también se representa en la Figura 1, un producto placentario de la presente invención sometido a un ciclo de congelación-descongelación comprende sorprendentemente una alta viabilidad celular. Como también se representa en la Figura 1, para un producto placentario de la presente invención, la viabilidad celular se retiene sorprendentemente bien después de un ciclo de congelación-descongelación

Ejemplo 9 Aislamiento de Células Placentarias

15 Se exploraron métodos de fabricación para obtener una recuperación superior de células vivas en la dispersión placentaria. Específicamente, se realizó un experimento para determinar el nivel de células viables en un producto placentario fabricado con o sin una etapa de aislamiento celular antes de la homogeneización. Resumiendo, una placenta se procesó según el procedimiento detallado en el Ejemplo 1. La membrana coriónica resultante se dividió después en mitades iguales. La mitad del tejido se procesó como se describe en los Ejemplos 2 a 5 y la otra mitad se procesó de la misma manera, pero sin aislamiento celular (digestión con colagenasa II) antes de la homogeneización, seguido de la recombinación de las células aisladas con la dispersión. Las células se contaron usando un hemocitómetro y se usó tinción con azul de tripán para distinguir las células vivas. Los datos se presentan en la Figura 5.

25 Los resultados indican que, sin digestión previa, la homogeneización elimina prácticamente todas las células viables de la dispersión final. Sorprendentemente, un producto placentario contiene un número sustancialmente mayor de células viables y proporciona una eficacia terapéutica potenciada cuando se fabrica con una etapa de aislamiento celular antes de la homogeneización.

Ejemplo 10 Perfil de un Producto Placentario

30 Se prepararon múltiples productos placentarios, cada uno de un donante diferente, según el procedimiento detallado en los Ejemplos 1 a 6 y se analizaron los factores placentarios. Brevemente, 1 mL de homogenado de cada producto placentario se centrifugó a 14.000 rpm en una microcentrífuga durante 10 min.

35 El sobrenadante resultante de cada muestra se recogió como una muestra de ensayo. Las muestras de control negativo consistieron en DMSO al 5 % en disolución salina (disolución de crioconservación) y las muestras de control positivo consistieron en disolución de crioconservación con una concentración conocida de proteínas recombinantes añadidas (bFGF, EGF y VEGF). Los perfiles de proteínas que comprenden factores placentarios listados en la Tabla 1 se obtuvieron usando el ensayo de matriz de proteínas SearchLight (Aushon Biosystems). Los resultados se indican en la Tabla 1 como niveles de expresión mínimo y máximo (pg/mL) en un conjunto de cuatro donantes. Como se analiza el sobrenadante en lugar del homogenado completo, es probable que las estimaciones del nivel de proteína estén por debajo de las concentraciones reales en cada homogenado de membrana coriónica que contiene células vivas. Los niveles de VEGF y bFGF en cada muestra se confirmaron por ELISA.

40 Sorprendentemente, muchos factores placentarios fueron detectables a niveles que se sabe que son influyentes para la curación de heridas por quemadura así como en el tratamiento de otras indicaciones.

Como se observa a partir de los datos en la Tabla 1, los productos placentarios de la presente invención comprenden un perfil terapéutico de factores placentarios.

45 La Tabla 2 muestra un perfil terapéutico de productos placentarios. Sólo ahora, con las enseñanzas de la presente memoria, el experto en la técnica puede examinar los factores placentarios, considerar el papel funcional como se muestra en la Tabla 3, y evaluar el valor de un factor placentario en la reparación de heridas.

Tabla 1 Perfil Terapéutico de Factores en los Productos Placentarios

| Proteína | Min. (pg/mL) | Máx. (pg/mL) | Media (pg/mL) | Función |
|----------|--------------|--------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| MMP1 | 2.210,07 | 3.468,94 | 2.808,12 | Degradación de la matriz y factor de crecimiento, facilita la migración celular |

ES 2 663 720 T3

| Proteína | Min. (pg/mL) | Máx. (pg/mL) | Media (pg/mL) | Función |
|---------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MMP2 | 8.207,46 | 70.964,65 | 25.648,74 | |
| MMP3 | 241,76 | 615,23 | 454,49 | |
| MMP7 | 79,78 | 4.429,02 | 1.190,31 | |
| MMP8 | 778,03 | 4.661,35 | 2.821,20 | |
| MMP9 | 32.879,10 | 14.9579,10 | 71.487,03 | |
| MMP10 | 6.728,94 | 22.686,00 | 14.688,40 | |
| MMP13 | DMPD | DMPD | DMPD | |
| TIMP1 | 18.739,41 | 315.870,30 | 116.341,69 | Inhibe la actividad de las MMP, angiogénico |
| TIMP2 | 71.60,87 | 60.711,15 | 21.335,46 | |
| TSP1 | DMPD | DMPD | DMPD | Regula la actividad de TGFβ, antiangiogénico |
| TSP2 | 1.123,02 | 18.784,67 | 6.190,03 | |
| TGFα TGFβ1 | DMPD 1.041,50 | DMPD 6.572,83 | DMPD 2.661,65 | Estimula el crecimiento y la migración Estimula la angiogénesis, también efectos proliferativos y estimuladores de la migración Promueve la angiogénesis, también los efectos proliferativos y estimuladores de la migración Inhibe la formación de cicatrices |
| TGFβ2 | 91,81 | 1.809,81 | 558,53 | |
| TGFβ3 | 77,02 | 146,31 | 104,35 | |
| bFGF (FGF-2) | 3.554,58 | 11.856,91 | 7.479,40 | Estimula la angiogénesis, también efectos proliferativos y estimuladores de la migración |
| KGF (FGF-7) | 14,15 | 111,58 | 45,72 | Estimula el crecimiento y migración celulares |
| EGF | 0,42 | 3,72 | 1,57 | Estimula el crecimiento y migración celulares |
| HB-EGF | DMPD | DMPD | DMPD | |
| PDGFAA | 39,20 | 173,52 | 77,46 | Estimula la angiogénesis, también efectos proliferativos y estimuladores de la migración |

ES 2 663 720 T3

| Proteína | Min. (pg/mL) | Máx. (pg/mL) | Media (pg/mL) | Función |
|------------------------------------------|--------------|---------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| PDGFAB | 495,90 | 495,90 | 495,90 | |
| PDGFBB | 7,73 | 235,85 | 70,56 | |
| VEGF | 13,95 | 211,17 | 76,73 | Promueve la angiogénesis, también efectos proliferativos y estimuladores de la migración |
| VEGFC | 64,77 | 178,51 | 118,71 | |
| VEGFD | 64,73 | 85,55 | 77,34 | |
| HGF | 9.180,77 | 71.280,10 | 27.480,10 | Inhibe la formación de cicatrices, estimula el crecimiento y migración celulares |
| PEDF | 805,18 | 805,18 | 805,18 | Estimula el crecimiento y la migración |
| ANG2 | DMPD | DMPD | DMPD | Estimula el crecimiento y la migración |
| IGFBP1 | 5.022,96 | 1.227.128,50 | 322.596,69 | Regula al IGF y sus efectos proliferativos |
| IGFBP2 | 564,62 | 564,62 | 564,62 | |
| IGFBP3 | 226,20 | 809,16 | 603,93 | |
| ACRP30 | 6.403,34 | 33.898,70 | 16.229,15 | Regula el crecimiento y actividad de los queratinocitos |
| Fibronectina | 2.950.999,50 | 90.198.200,00 | 24.973.399,00 | ECM, adhesión celular, estimula el crecimiento y migración |
| Alfa2mac | 280.783,30 | 4.653.881,00 | 1.554.151,49 | Inhibe la actividad proteasa, coordina la biodisponibilidad de factores de crecimiento |
| IL1ra | 961,93 | 10.035,52 | 3.568,27 | Antiinflamatorio |
| NGAL | 420,82 | 2.908,38 | 1.592,17 | Antibacteriano |
| SDF1b | DMPD | DMPD | DMPD | Recluta células de la circulación al sitio de lesión tisular |
| DMPD = Demasiado Bajo Para ser Detectado | | | | |

Tabla 2 Perfil Terapéutico de Factores en la Membrana Coriónica

| Proteína | Mín. (pg/mL) | Máx. (pg/mL) | Media (pg/mL) |
|--------------|--------------|--------------|---------------|
| MMP1 | 2.882,87 | 6.582,26 | 4.732,56 |
| MMP2 | 748,82 | 949,52 | 849,17 |
| MMP3 | DBPD | DBPD | DBPD |
| MMP7 | 4,46 | 9,07 | 6,76 |
| MMP8 | DBPD | DBPD | DBPD |
| MMP9 | 1.259,30 | 2.676,23 | 1.967,77 |
| MMP10 | 79,31 | 87,51 | 83,41 |
| MMP13 | DBPD | DBPD | DBPD |
| TIMP1 | 17.419,86 | 50.712,30 | 34.066,08 |
| TIMP2 | 640,73 | 779,98 | 710,36 |
| TGF α | DBPD | DBPD | DBPD |
| bFGF (FGF-2) | 351,28 | 375,05 | 363,17 |
| KGF (FGF-7) | 1,53 | 3,07 | 2,30 |
| EGF | 0,75 | 0,75 | 0,75 |
| HB-EGF | 15,40 | 84,49 | 49,94 |
| PDGFAA | 35,25 | 39,79 | 37,52 |
| PDGFAB | 14,03 | 14,43 | 14,23 |
| PDGFBB | 1,29 | 3,99 | 2,64 |
| VEGF | 8,39 | 125,16 | 66,78 |
| VEGFC | 51,74 | 123,45 | 87,60 |
| VEGFD | 14,99 | 20,42 | 17,70 |
| HGF | 29.979,57 | 50.392,75 | 40.186,16 |
| PEDF | DBPD | DBPD | DBPD |
| ANG2 | DBPD | DBPD | DBPD |
| IGFBP1 | 934,03 | 1.443,63 | 1.188,83 |

ES 2 663 720 T3

| Proteína | Mín. (pg/mL) | Máx. (pg/mL) | Media (pg/mL) |
|------------------------------------------|--------------|--------------|---------------|
| IGFBP2 | 134,61 | 135,86 | 135,24 |
| IGFBP3 | 4.571,51 | 11.970,15 | 8.270,83 |
| LIF | DBPD | DBPD | DBPD |
| GCSF | 0,74 | 1,22 | 0,98 |
| TPO | DBPD | DBPD | DBPD |
| PIGF | DBPD | DBPD | DBPD |
| ACRP30 | 225,35 | 1.213,70 | 719,52 |
| Alfa2mac | 8.174,44 | 9.968,59 | 9.071,52 |
| IL1ra | 525,53 | 5.168,21 | 2.846,87 |
| NGAL | 229,72 | 938,51 | 584,11 |
| SDF1b | DBPD | DBPD | DBPD |
| DBPD = Demasiado Bajo Para ser Detectado | | | |

Tabla 3 Funciones de los Factores Placentarios

| Proteínas Específicas | Funciones Seleccionadas |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Metaloproteinasa de matriz 1 (MMP1), MMP2, 3, 7, 8, 9, 10, 13 | Degradación de la matriz y factor de crecimiento, facilita la migración celular |
| Inhibidores tisulares de las MMP (TIMP1 y TIMP2) | Inhibe la actividad de las MMP, angiogénico |
| Angiotensina-2 (Ang-2), Factor de Crecimiento Epidérmico Unido a Heparina (HB-EGF), EGF, FGF-7 (también conocido como Factor de Crecimiento de Queratinocitos-KGF), Factor de Crecimiento Placentario (PIGF), Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF), Trombopoyetina (TPO), Factor de Crecimiento Transformante- α (TGF- α) | Estimula el crecimiento y la migración |
| Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF), Factores de Crecimiento Derivados de Plaquetas (PDGF) AA, AB y BB, Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), VEGF-C y VEGF-D | Estimula la angiogénesis, también efectos proliferativos y estimuladores de la migración |
| TGF- β 3, Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) | Inhibe la formación de cicatrices |
| α 2-macroglobulina | Inhibe la actividad proteasa, coordina la biodisponibilidad de factores de crecimiento |

| Proteínas Específicas | Funciones Seleccionadas |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Adiponectina (Acrp-30) | Regula el crecimiento y la actividad de los queratinocitos |
| Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) | Estimula la migración y proliferación de células madre |
| Antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1RA) | Antiinflamatorio |
| Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos (N-GAL) | Antibacteriano |
| Factor inhibidor de leucemia (LIF) | Soporte de factores de crecimiento angiogénicos |
| SDF-1 β | Recluta células de la circulación al sitio de lesión tisular |
| Proteína de Unión al Factor de Crecimiento Semejante a Insulina (IGFBP1, 2, 3) | Regula al IGF y sus efectos proliferativos |

Ejemplo 11 Fenotipo Celular

Se realizó FACS para determinar el fenotipo celular en un producto placentario de la presente invención. Los productos placentarios se prepararon según el procedimiento detallado en los Ejemplos 1 a 6. Los productos se descongelaron y posteriormente se filtraron a través de un filtro de 100 μ m para eliminar restos tisulares. Entonces se centrifugaron suspensiones de células sueltas usando un Beckman TJ-6 a 2.000 rpm durante 10 min y se lavaron dos veces con DPBS. El sobrenadante se desechó después de cada lavado, y las células se resuspendieron en 2 mL de tampón de tinción FACS (DPBS + NaN₃ al 0,09 % + FBS al 1 %).

Una vez se prepararon las suspensiones de células sueltas, se trató un mínimo de 1x10⁵ células en 100 μ L de tampón de tinción FACS con anticuerpos marcados con agente de tinción fluorescente. La Tabla 4 proporciona descripciones de los anticuerpos y las cantidades usadas. Para los marcadores de superficie celular, las células se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad con anticuerpos, seguido de lavado dos veces con tampón de tinción FACS por centrifugación a 1.300 rpm durante 5 min usando una centrifuga Beckman TJ-6. Después, las células se resuspendieron en 400 μ L de tampón de tinción FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACSCalibur. Los resultados indican que un producto placentario derivado de corion contiene células vivas que se tiñen de forma positiva para marcadores de MSC (Figura 6), lo que implica la presencia de células semejantes a MSC.

Tabla 4 Anticuerpos FACS

| Anticuerpo de marcaje celular y tipo de marcador | Cat. No. | Volumen de disolución de anticuerpo usado | Tipo de marcador celular | Especificidad de marcador celular |
|--------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| IgG1 isotipo-PE | BD 559320 | 5 μ L | Superficie celular | Control de isotipo |
| CD105-PE | Caltag MHCD10504 | 20 μ L | Superficie celular | Marcador de MSC |
| CD166-PE | BD 559263 | 80 μ L | Superficie celular | Marcador de MSC |
| CD45-PE | BD 555483 | 10 μ L | Superficie | Marcador de células |

| Anticuerpo de marcaje celular y tipo de marcador | Cat. No. | Volumen de disolución de anticuerpo usado | Tipo de marcador celular | Especificidad de marcador celular |
|--------------------------------------------------|----------|-------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| | | | celular | hematopoyéticas |

Ejemplo 12 Optimización de Crioprotectores

Según el procedimiento detallado en los Ejemplos 1 a 2 se procesó una placenta. La suspensión de la digestión resultante que comprendía células se dividió en varias partes alícuotas, y cada una de ellas se procesó según el procedimiento detallado en los Ejemplos 3 a 5 usando un crioprotector diferente. Se analizaron tres crioprotectores diferentes para determinar su capacidad de potenciar el número de células viables recuperadas después de la congelación y para conservar la recuperación de proteínas después de la congelación. Se ensayaron las siguientes disoluciones de crioprotector:

- 1.- DMSO al 10 % y HSA al 5 % en Plasma-Lyte A (disolución CTR)
- 2.- DMSO al 5% y HSA al 5% en Plasma-Lyte A
- 3.- DMSO al 10 % en Disolución Salina
- 4.- DMSO al 5 % en Disolución Salina
- 5.- Glicerol al 10% en Disolución Salina

Antes de congelar y después de descongelar, las células se contaron usando un hemocitómetro y se usó tinción con azul de tripán para distinguir las células vivas. Para calcular el número de células por mL de homogenado se usó la siguiente fórmula: Células por ml = (No. de Células contadas por cuatro cuadrados de 0,0001 mL) X 10.000 X factor de dilución. Los resultados se representan en la Figura 7.

Ejemplo 13 Optimización de la evolución temporal de la digestión con colagenasa de tejido coriónico.

Para determinar el tiempo óptimo para digerir un tejido placentario, tal como tejidos coriónicos, en colagenasa II, se analizaron los tejidos coriónicos de tres donantes diferentes. Los tejidos se incubaron durante toda la noche en una mezcla de antibióticos. Cada tejido de membrana coriónica se lavó dos veces para eliminar la disolución de antibiótico y se dividió en tres partes. Cada parte de tejido se pesó para obtener un peso inicial (0 min) antes de digerirse durante 10, 20 o 30 minutos en disolución de colagenasa II (300 U/mL).

Al final de cada periodo de digestión, el tejido remanente se separó de la disolución de colagenasa II que contenía las células aisladas, mediante filtración a través de un filtro celular de 100 µm de poro. Después, el tejido separado se pesó mientras que la disolución de colagenasa II que contenía las células digeridas se centrifugó. El sedimento celular resultante se resuspendió en PBS y se contó usando un hemocitómetro con exclusión de azul de tripán.

El peso de cada parte de tejido remanente, incluyendo el peso del tejido que permaneció en el filtro celular, se usó para calcular el porcentaje de pérdida de peso por la digestión con la colagenasa II.

Como se muestra en la Figura 8, después de 10 min de digestión, aproximadamente el 10 % del peso del tejido original se redujo. La incubación adicional produjo una pérdida de peso más drástica. A los 30 minutos, casi la mitad del peso original se había perdido. Se observó además que el tejido digerido durante más de 10 min se volvió extremadamente difícil de separar de la disolución de colagenasa II.

La Figura 8 también muestra el número de células liberadas por la digestión con colagenasa. Después de 10 minutos de incubación, se liberó un número sustancial de células. Sin embargo, a los 20 minutos, el número de células liberadas se incrementó aproximadamente 4 veces.

Estos resultados demuestran sorprendentemente que realizando sólo una digestión limitada con colagenasa (p. ej., aproximadamente 10 minutos), puede liberarse un número sustancial de células placentarias y que la integridad del tejido placentario se mantiene. De acuerdo con esto, cuando el tejido placentario sometido a digestión limitada con colagenasa se disrumpe posteriormente, la dispersión retiene una cantidad sustancial de su carácter nativo. Por ejemplo, los inventores observan generalmente que después de una digestión prolongada con colagenasa (p. ej., 30 minutos), el tejido placentario puede pasarse a través de un filtro de 100 micrómetros. Esto difiere de la digestión limitada en la que sustancialmente menos (p. ej., una mitad o un cuarto o menos) del tejido puede pasarse a través de un filtro de 100 micrómetros.

Cuando esta dispersión se combina con las células placentarias liberadas, se produce un producto terapéutico

superior.

En datos no mostrados, no se observó un cambio significativo en la viabilidad de las células liberadas por colagenasa a lo largo de 30 min de digestión.

Ejemplo 14 Optimización de la evolución temporal de la digestión con colagenasa de tejido amniótico

- 5 El método de digestión limitada del Ejemplo 13 se ensayó para determinar su aplicabilidad cuando el tejido placentario es tejido amniótico. Se realizó el procedimiento siguiente:
1. Procesar la placenta.
 - a. Retirar el tejido amniótico y lavar dos veces en PBS.
 - b. Empapar el tejido amniótico para soltar los glóbulos rojos.
 - 10 i. Si es necesario, quitar los glóbulos rojos del tejido usando los dedos.
 - c. Incubar el tejido amniótico durante 24 h en mezcla de antibióticos.
 2. Retirar el tejido amniótico de la mezcla de antibióticos y lavar dos veces en PBS.
 3. Incubar el tejido amniótico durante 30 min a 37 °C en 200 mL de disolución de tripsina (0,25 %).
 4. Retirar el tejido amniótico de la disolución de tripsina y lavar dos veces en PBS.
 - 15 5. Incubar el tejido amniótico durante 10 min a 37 °C en 200 mL de disolución de colagenasa II (300 U/mL en DMEM).
 6. Retirar el tejido amniótico de la disolución de colagenasa II y lavar dos veces en PBS.
 7. Procesamiento de suspensiones de células vivas con colagenasa II y tripsina.
 - a. Centrifugar cada suspensión a 2.000 rcf durante 5 min.
 - 20 b. Retirar por vertido cada sobrenadante y reemplazar con 10 mL de PBS.
 - i. Resuspender las células en PBS para lavar.
 - c. Centrifugar la suspensión celular a 2.000 rcf durante 5 min.
 - d. Retirar por vertido los sobrenadantes y resuspender las células en 2 mL de crioprotector (DMSO al 5 % en disolución salina).
 - 25 e. Combinar los sedimentos.
 8. Procesamiento de tejido amniótico.
 - a. Poner el tejido amniótico en un contenedor de homogeneización con un volumen de crioprotector (mL) igual al peso de la membrana amniótica (g). Por ejemplo, si la membrana amniótica pesa 25 g ponerla en el contenedor de homogeneización con 25 mL de crioprotector.
 - 30 b. Dejar el tejido amniótico y el crioprotector en hielo durante al menos 10 min.
 - c. Homogeneizar a alta velocidad dos veces durante 5 s usando un homogeneizador de tejidos.
 9. Combinar las células vivas aisladas con el homogenado y mezclar concienzudamente (el "producto placentario").
 10. Dividir en viales en partes alícuotas y poner a 4 °C durante 30-60 min.
- Congelar a -80 °C hasta su uso.
- 35 Para determinar el número medio de células vivas en el homogenado amniótico, se procesaron múltiples placentas. Cada amnios se procesó en una parte, y los recuentos celulares se obtuvieron después de la descongelación tras la crioconservación (incubación a 4 °C y congelación posterior a -80 °C). Todos los datos de los recuentos celulares se combinaron y se calculó una media.
- 40 Las muestras de cada donante también se prepararon para análisis por matriz de proteínas. Brevemente, 1 mL de homogenado de cada donante se centrifugó a 14.000 rpm en una microcentrífuga durante 10 min. El sobrenadante resultante de cada muestra se recogió. Los sobrenadantes junto con los controles positivos y negativos se enviaron

5 a Aushon Biosystems para análisis usando su ensayo de matriz de proteínas SearchLight. Este ensayo mide los niveles de 37 proteínas de interés en cada muestra. Para este experimento, las muestras de control negativo consistieron en DMSO al 5 % en disolución salina (disolución de crioconservación) y las muestras de control positivo consistieron en disolución de crioconservación con concentraciones conocidas de proteínas recombinantes añadidas (bFGF, EGF y VEGF).

El análisis FACS de suspensiones de células sueltas del producto placentario se realizó para los marcadores CD45, CD105 y CD166.

Resultados

10 Como se muestra en la Figura 9, la digestión limitada con colagenasa de tejido de membrana amniótica produjo la liberación de un número sustancial de células placentarias vivas.

Como se muestra en la Tabla 5, la digestión limitada con colagenasa de tejido de membrana amniótica conservó los factores placentarios en la dispersión placentaria preparada a partir de los mismos.

15 Cuando los Ejemplos 13 y 14 se consideran conjuntamente, se concluye ahora que la digestión limitada con colagenasa de tejido placentario, ya sea tejido coriónico, tejido amniótico u otro tejido de origen placentario, produce inesperadamente:

Cantidades sustanciales de células placentarias vivas liberadas;

Factores placentarios endógenos conservados;

Proteína placentaria endógena conservada (p. ej., proteínas de la matriz); y

Un producto terapéuticamente efectivo.

20 **Tabla 5 Perfiles Terapéuticos de Productos Placentarios Derivados de Amnios**

| Proteína | Mín. (pg/mL) | Máx. (pg/mL) | Media (pg/mL) |
|---------------|--------------|--------------|---------------|
| MMP1 | 6.697,73 | 10.010,27 | 8.354 |
| MMP2 | 5.456,52 | 53.432,45 | 29.444,49 |
| MMP3 | 570,97 | 579,1 | 575,04 |
| MMP7 | 74,11 | 207,31 | 140,71 |
| MMP8 | 3.829,63 | 3.978,42 | 3.904,03 |
| MMP9 | 11.735,19 | 43.661,63 | 27.698,41 |
| MMP10 | 38.916,81 | 51.526,9 | 45.221,86 |
| MMP13 | DBPD | DBPD | DBPD |
| TIMP1 | 31.427,94 | 78.147 | 54.787,47 |
| TIMP2 | 6.149,25 | 23.167,29 | 14.658,27 |
| TSP1 | DBPD | DBPD | DBPD |
| TSP2 | 7.741,98 | 13.312,64 | 10.527,31 |
| TGF α | DBPD | DBPD | DBPD |
| TGF β 1 | 85,17 | 350,51 | 217,84 |

ES 2 663 720 T3

| Proteína | Mín. (pg/mL) | Máx. (pg/mL) | Media (pg/mL) |
|------------------------------------------|--------------|--------------|---------------|
| TGFβ2 | 47,98 | 58,6 | 53,29 |
| bFGF (FGF-2) | 19.305,72 | 23.427,48 | 21.366,6 |
| KGF (FGF-7) | 70,39 | 94,29 | 82,34 |
| EGF | 13,71 | 69,55 | 41,63 |
| HB-EGF | DBPD | DBPD | DBPD |
| PDGFAA | 14,47 | 27,93 | 21,2 |
| PDGFAB | DBPD | DBPD | DBPD |
| PDGFBB | 7,49 | 12,34 | 9,91 |
| VEGF | 346,3 | 1.058,85 | 702,57 |
| VEGFC | 114,35 | 220,27 | 167,31 |
| VEGFD | 49,54 | 75,29 | 62,42 |
| HGF | 12.068,53 | 17.408,53 | 14.738,53 |
| PEDF | DBPD | DBPD | DBPD |
| ANG2 | DBPD | DBPD | DBPD |
| IGFBP1 | 128,6 | 159,84 | 144,22 |
| IGFBP2 | DBPD | DBPD | DBPD |
| IGFBP3 | 699,01 | 1.349,06 | 1.024,04 |
| ACRP30 | 6.677,35 | 11.232,13 | 8.954,74 |
| Fibronectina | 141.595,2 | 254.184,05 | 197.889,63 |
| Alfa2mac | 421.402,95 | 79.0851 | 606.126,98 |
| IL1ra | 7.542,74 | 10.535,55 | 9.039,14 |
| NGAL | 1.521,63 | 3.283,59 | 2.402,61 |
| SDF1b | DBPD | DBPD | DBPD |
| DBPD = Demasiado Bajo para ser Detectado | | | |

Ejemplo 15 Células Vivas de los Componentes de las Dispersiones Placentarias y las Células Placentarias del Producto Placentario

Las etapas de fabricación enseñadas en la presente memoria (p. ej., digestión limitada con colagenasa, retirada de células placentarias antes de la disrupción del tejido placentario, y métodos de disrupción limitada) dan como resultado un producto terapéutico altamente efectivo. El papel relativo de los componentes de la dispersión placentaria y células placentarias se evaluó para determinar el papel respectivo en el suministro de células vivas.

- 5 Se obtuvo tejido coriónico de tejido placentario de 9 sujetos y se evaluó la cantidad de células vivas de las células placentarias (p. ej., liberadas con colagenasa) y de la dispersión placentaria.

Tabla 6 Células Placentarias de las Fracciones de Células Placentarias y de Dispersión Placentaria

| Donante | Células en la fracción de células placentarias (liberadas por colagenasa) | Células en la fracción de dispersión placentaria | Células teóricas en el producto placentario |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| D144 | 3,84E+05 | 7,95E+06 | 8,33E+06 |
| D145 | 8,40E+05 | 1,25E+07 | 1,33E+07 |
| D146 | 1,60E+05 | 7,84E+06 | 8,00E+06 |
| D147 | 2,17E+07 | 5,70E+06 | 2,74E+07 |
| D153 | 3,26E+06 | 1,64E+07 | 1,97E+07 |
| D154 | 3,70E+05 | 1,07E+07 | 1,11E+07 |
| D155 | 2,08E+06 | 7,10E+06 | 9,18E+06 |
| D156 | 4,90E+05 | 1,26E+07 | 1,31E+07 |
| Media | 3,66E+06 | 1,01E+07 | 1,38E+07 |

5 Como se muestra en la Tabla 6, del 21 % al 98 % de las células en los productos placentarios derivaban del componente de dispersión placentaria. Así, los métodos de la presente invención conservan inesperadamente factores placentarios importantes y células vivas en la dispersión placentaria y también proporcionan cantidades sustanciales de células vivas del componente de células placentarias (liberadas con colagenasa).

Ejemplo 16 Tratamiento de Hipoxia

10 Los resultados de estudios particulares indican que la hipoxia induce muchas proteínas que tienen funciones beneficiosas en el proceso de curación de heridas por quemadura. Sin embargo, el grado en el que la hipoxia afecta el crecimiento celular y a la expresión de proteínas depende de las condiciones específicas de su aplicación. Por lo tanto, se realizaron varios experimentos para determinar si la hipoxia podría potenciar la eficacia de productos placentarios derivados de corion.

15 Según el procedimiento detallado en el Ejemplo 1 se procesó una placenta, excepto que la membrana coriónica se dividió en dos mitades antes del tratamiento con la mezcla de antibióticos. Una mitad del tejido de la membrana coriónica se incubó en condiciones hipóxicas (O_2 al 1 %) mientras la otra se incubó en condiciones de cultivo celular normales (O_2 a ~ 20 %). Después, cada mitad se procesó como se describe en los Ejemplos 2 a 5. Antes de congelar y después de descongelar, las células se contaron usando un hemocitómetro y se usó tinción con azul de tripán para distinguir las células vivas. Los resultados se representan en la Figura 10.

Ejemplo 17 Tratamiento de Hipoxia y Crioprotectores

20 Según el procedimiento detallado en el Ejemplo 15 se procesó una placenta, excepto que los digeridos de cada mitad de la membrana coriónica se dividieron adicionalmente y se formularon con diferentes crioprotectores, como en el Ejemplo 12. Antes de congelar y después de descongelar, las células se contaron usando un hemocitómetro y se usó tinción con azul de tripán para distinguir las células vivas. Los datos se presentan en la Figura 11. Como se representa en la Figura 11, el procesamiento en condiciones normóxicas proporciona una viabilidad celular superior. 25 También como se representa en la Figura 11, el someter al corion a condiciones hipóxicas puede ser perjudicial para la viabilidad celular.

Ejemplo 18 Los Factores de Crecimiento se Expresan durante un Mínimo de 14 días

30 Los productos placentarios de la presente invención demuestran un efecto duradero, deseable para los tratamientos de cicatrización de heridas. La matriz extracelular y la presencia de células viables en el producto placentario derivado de la membrana coriónica descrita en esta invención permiten que durante al menos 14 días esté presente una mezcla de proteínas que se sabe que son importantes para la cicatrización de heridas.

El producto placentario derivado de la membrana coriónica se descongeló y se sembró en placas en pocillos de cultivo tisular y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3, 7 y 14 días. A cada punto de tiempo, se recogió una muestra del producto y se centrifugó a 16.000g durante 10 min para recoger el sobrenadante. Los sobrenadantes se operaron en ensayos ELISA para bFGF y VEGF. La Figura 12 ilustra la duración de dos proteínas clave de cicatrización de heridas, bFGF y VEGF, a los 3, 7 y 14 días. Aunque la expresión de bFGF disminuye con el tiempo, debe indicarse que estaban presentes niveles significativos de bFGF incluso a los 14 días. Cabe destacar que, la expresión de VEGF se incrementó con el tiempo, lo que podría deberse a una expresión activa continuada de VEGF de las células viables en el producto placentario derivado de la membrana coriónica.

Ejemplo 19 Interferón 2 α (IFN-2 α) y Factores de Crecimiento Transformantes- β 3 (TGF- β 3)

El interferón-2 α y TGF- β 3 se han descrito en la bibliografía como que juegan papeles críticos en la prevención de formación de cicatrices y contracturas (Kwan et al., *Hand Clin.*, 2009, 25:511; Tredget et al., *Surg. Clin. North Am.* 1997, 77:701). Se sabe que el IFN-2 α disminuye la síntesis de colágeno y fibronectina y la contractura de heridas mediada por fibroblastos. Clínicamente, el IFN-2 α se ha administrado por vía subcutánea y ha mostrado mejorar la calidad de las cicatrices (Nedelec et al., *J. Lab. Clin. Med.* 1995, 126:474). El TGF- β 3 regula la deposición de matriz extracelular y se ha mostrado que disminuye la formación de cicatrices cuando se inyecta en modelos de herida cutánea en roedores. Clínicamente, se ha mostrado que el TGF- β 3 mejora la apariencia de las cicatrices cuando se inyecta en el sitio de la herida (Occlleston et al., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2008, 19:1047). El producto placentario derivado de la membrana coriónica descrito en esta invención se ha analizado para determinar la presencia de IFN-2 α y TGF- β 3. Brevemente, el producto placentario derivado de la membrana coriónica se descongeló y se centrifugó a 16.000g para recoger sobrenadantes. Los sobrenadantes se analizaron en un kit de ELISA disponible comercialmente de MabTech (IFN-2 α) y R&D Systems (TGF- β 3). La Figura 13 muestra expresión significativa de IFN-2 α y TGF- β 3 en productos placentarios derivados de la membrana coriónica.

Ejemplo 20 Proteínas de Reparación Tisular en Homogenados de Membrana Coriónica

El producto placentario derivado de la membrana coriónica se analizó para determinar la presencia de proteínas que son importantes en la reparación tisular.

Los productos placentarios derivados de las membranas coriónicas descritos en esta invención se analizaron para determinar la presencia de estas proteínas de reparación tisular. Brevemente, el producto placentario derivado de la membrana coriónica se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 h. El producto se centrifugó y el sobrenadante se analizó en kits de ELISA disponibles comercialmente de R&D Systems. La **Figura 14** muestra expresión significativa de BMP-2, BMP-4, BMP-7, PLAB, PIGF e IGF-1 en varios donantes de productos placentarios derivados de membranas coriónicas.

Sin limitarse a teoría alguna, los inventores creen que la eficacia de los presentes productos placentarios para la reparación de heridas se debe, en parte, al papel de BMP, IGF-1 y PIGF en el desarrollo y la homeostasis de diversos tejidos mediante la regulación de procesos celulares clave. BMP-2 y BMP-4 pueden estimular la diferenciación de las MSC en osteoblastos además de promover el crecimiento celular; la BMP placentaria o PLAB es un miembro novedoso de la familia de BMP que se sugiere que actúa como mediador en el desarrollo embrionario. El factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF-1) puede estimular la proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras. El factor de crecimiento derivado de placenta (PIGF) puede actuar como un mitógeno para osteoblastos.

Ejemplo 21 Capacidad de Diferenciación de Células Derivadas de la Membrana Coriónica

Las células placentarias, en realizaciones opcionales de la presente invención, son adherentes, expresan marcadores celulares específicos, tales como CD105, y carecen de expresión de otros marcadores, tales como CD45, y demuestran la capacidad de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y condroblastos.

La expresión de marcadores celulares específicos ya se ha descrito en el Ejemplo 20. Para determinar si las células dentro del producto placentario derivado de la membrana coriónica, pueden adherirse a plástico y diferenciarse en uno de los linajes, se aislaron células del producto placentario derivado del corion como se describe en esta invención y se cultivaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se expandieron.

La Figura 15-A muestra una imagen representativa de células en subcultivo 2, que demuestra la capacidad de las células de adherirse a plástico de cultivo tisular. Como una comparación, en la Figura 15-B se muestra una imagen representativa de MSC aisladas y expandidas de aspirado de médula ósea humana.

La capacidad de diferenciación osteógena se demostró por tinción de las células cultivadas con marcaje por fosfatasa alcalina siguiendo las recomendaciones del fabricante (BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV, Vector Laboratories n.º cat. SK-5400). La fosfatasa alcalina es una enzima implicada en la mineralización de los huesos (Allori et al., *Tissue Engineering: parte B*, 2008, 8:275), y su expresión dentro de las células es indicativa de células osteoprecursoras (Majors et al., *J Orthopaedic Res*, 1997, 15:546). La tinción para fosfatasa alcalina se realiza a través de una reacción enzimática con sal de p-Toluidina de Bromo-4-Cloro-3'-Indolifosfato (BCIP) y

Cloruro de Nitroazul de Tetrazolio (NTP). La BCIP se hidroliza por fosfatasa alcalina para formar un producto intermedio que experimenta dimerización para producir un colorante índigo. El NBT se reduce a NBT-formazán por los dos equivalentes de reducción generados por la dimerización. En conjunto, estas reacciones producen un precipitado insoluble de color negro-púrpura intenso cuando se hace reaccionar con fosfatasa alcalina.

- 5 La Figura 15 - C muestra una imagen representativa de células en subcultivo 2 aisladas y expandidas a partir del producto placentario derivado de la membrana coriónica que se tiñen positivamente para fosfatasa alcalina.

REIVINDICACIONES

1. Un método de fabricación de un producto placentario terapéutico que comprende:
- a) obtener células placentarias viables de un primer tejido placentario obtenido;
 - 5 b) retirar los trofoblastos del corion de un segundo tejido placentario obtenido que comprende corion y trofoblastos;
 - c) después de la etapa b), disrumpir el segundo tejido placentario para formar una dispersión placentaria en la que la dispersión placentaria comprende tejido de corion disrumpido, células viables y factores placentarios en el que los factores placentarios se seleccionan del grupo que consiste en factores angiogénicos, quimioquinas, citoquinas, factores de crecimiento, proteasas, inhibidores de proteasas, y componentes de la matriz; y
 - 10 d) combinar las células placentarias y la dispersión placentaria para formar el producto placentario.
2. El método de la reivindicación 1 en el que el primer tejido placentario es autólogo respecto al segundo tejido placentario.
3. El método de la reivindicación 1 en el que el segundo tejido placentario deriva del primer tejido placentario después de la etapa de obtener las células placentarias.
- 15 4. El método de la reivindicación 3 en el que la etapa de obtener las células placentarias comprende exponer el primer tejido placentario a una proteasa, preferiblemente una colagenasa, en particular colagenasa II.
5. El método de la reivindicación 4 en el que la etapa de exposición a la proteasa tiene una duración de aproximadamente 30 minutos o menos y preferiblemente libera menos de aproximadamente 10 % del número máximo de células placentarias liberables.
- 20 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que el primer tejido placentario y el segundo tejido placentario son un tejido amniótico o un tejido coriónico.
7. El método de la reivindicación 6 en el que la etapa de retirada de trofoblastos comprende disección y tratamiento con dispa.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que los factores placentarios comprenden dos o más factores placentarios mostrados en el grupo que consiste en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3 o Tabla 5.
- 25 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que los factores placentarios comprenden dos o más factores placentarios mostrados en la Tabla 1 en una cantidad en el intervalo mostrado en la Tabla 1, mostrados en la Tabla 2 en una cantidad en el intervalo mostrado en la Tabla 2 o mostrados en la Tabla 5 en una cantidad en el intervalo mostrado en la Tabla 5.
- 30 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el producto placentario comprende uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en:
- una proteína de la matriz extracelular;
 - un inhibidor de proteasa;
 - un factor angiogénico; y
 - 35 un factor placentario que estimula la migración de células epiteliales en una herida.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que los factores placentarios comprenden uno o más inhibidores de proteasa seleccionados del grupo que consiste en metaloproteinasa de matriz (TIMP), alfa-2 macroglobulina y trombospondinas, uno o más factores angiogénicos seleccionados del grupo que consiste en VEGF y bFGF o uno o más factores que estimulan la migración de células epiteliales en una herida seleccionados del grupo que consiste en HGF y KGF.
- 40 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que el producto placentario comprende uno o más inhibidores de proteasa seleccionados del grupo que consiste en metaloproteinasa de matriz (TIMP), alfa-2 macroglobulina, y trombospondinas, uno o más factores angiogénicos seleccionados del grupo que consiste en VEGF y bFGF o uno o más factores que estimulan la migración de células epiteliales en una herida seleccionados del grupo que consiste en HGF y KGF.
- 45 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que las células placentarias se seleccionan del grupo que consiste en células madre mesenquimales (MSC), células estromales endometriales (ESC), células progenitoras mesenquimales derivadas de la placenta, células madre mesenquimales placentarias, fibroblastos, células

epiteliales, células mesenquimales placentarias, macrófagos y células estromales.

14. El método de la reivindicación 13 en el que:

a) las células placentarias son células estromales;

b) las células placentarias se crioconservan, y

5 c) la dispersión placentaria es un homogenado.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que las células placentarias están presentes a una concentración de al menos aproximadamente 20.000 por ml de producto placentario.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que la dispersión placentaria es un homogenado.

10 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que las células placentarias se crioconservan y preferiblemente las células placentarias se crioconservan antes de combinarlas con la dispersión placentaria.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 17 en el que la dispersión placentaria se crioconserva.

15 19. Un producto placentario terapéutico que comprende células placentarias viables y una dispersión placentaria, en el que la dispersión placentaria (i) es una dispersión de corion que carece de componentes trofoblásticos y (ii) comprende tejido de corion disrumpido, células viables y factores placentarios, en el que los factores placentarios se seleccionan del grupo que consiste en factores angiogénicos, quimioquinas, citoquinas, factores de crecimiento, proteasas, inhibidores de proteasas, y componentes de la matriz.

20. Un producto placentario terapéutico de la reivindicación 19 para su uso en un método para tratar una lesión tisular en un sujeto, en el que la lesión tisular es preferiblemente una quemadura o una herida.

20 21. El producto placentario terapéutico para el uso de la reivindicación 20, en el que el producto placentario terapéutico es autólogo respecto al sujeto.

FIGURA 1

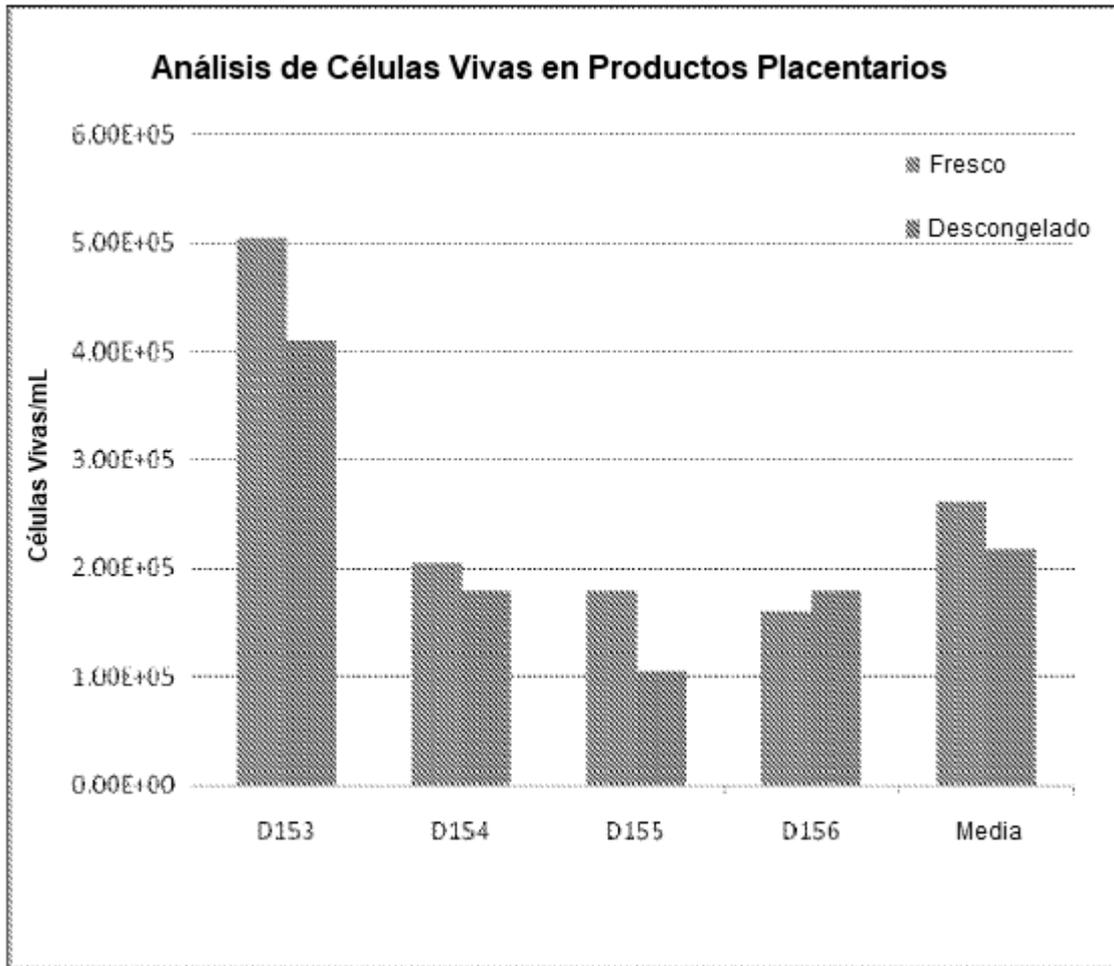


FIGURA 2

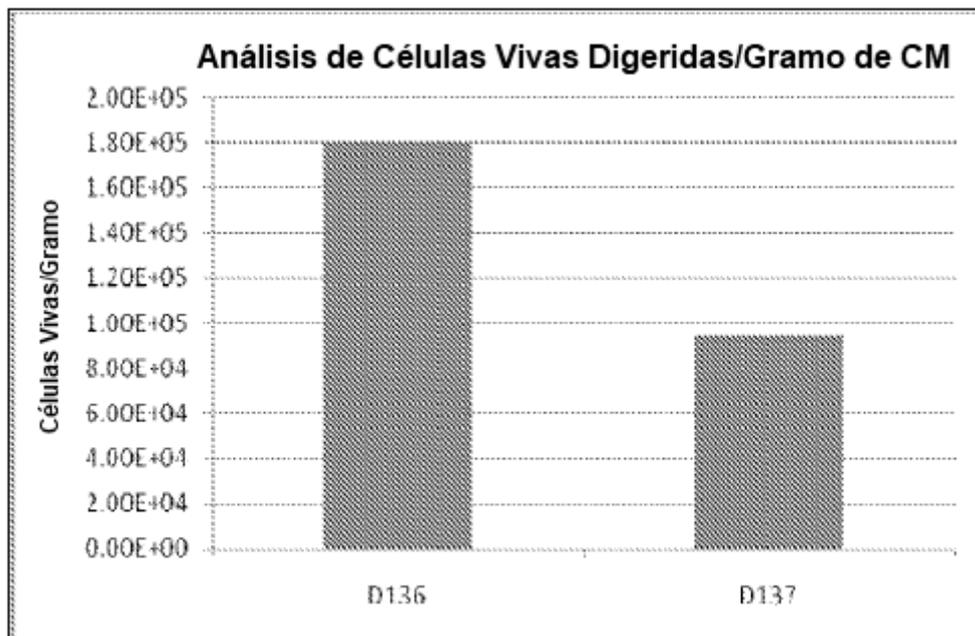


FIGURA 3

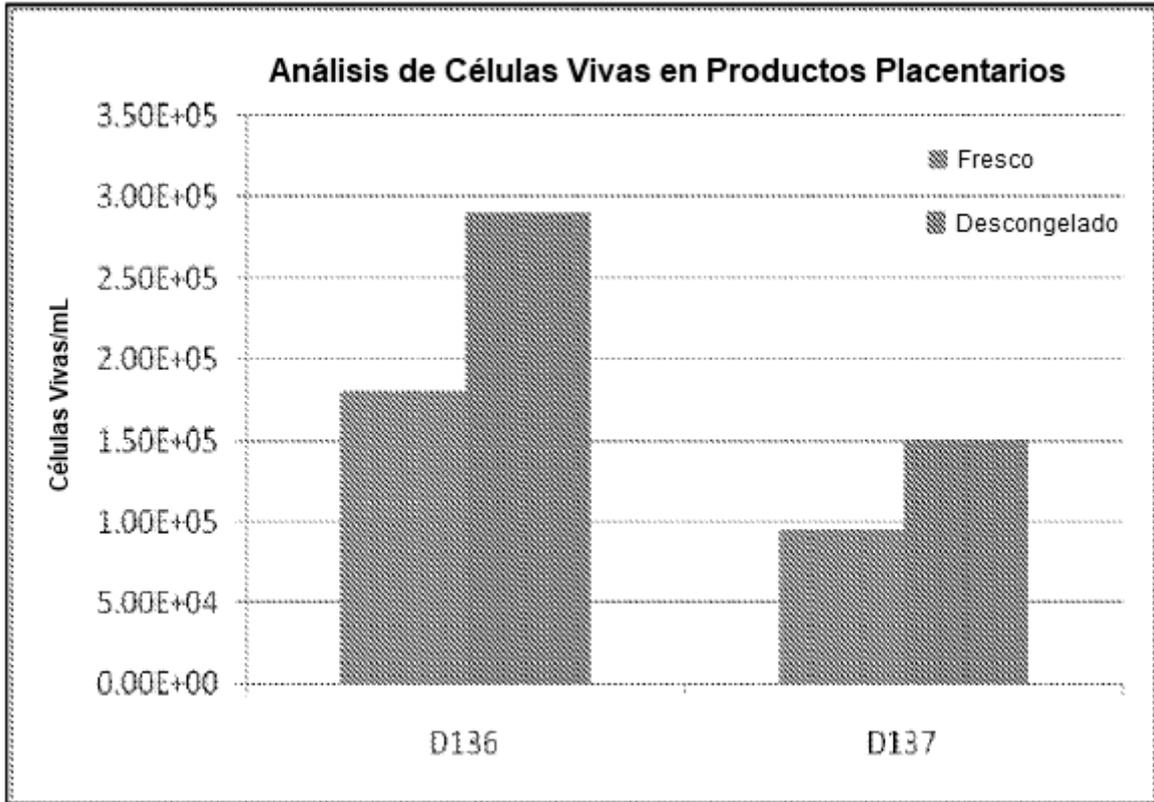


FIGURA 4

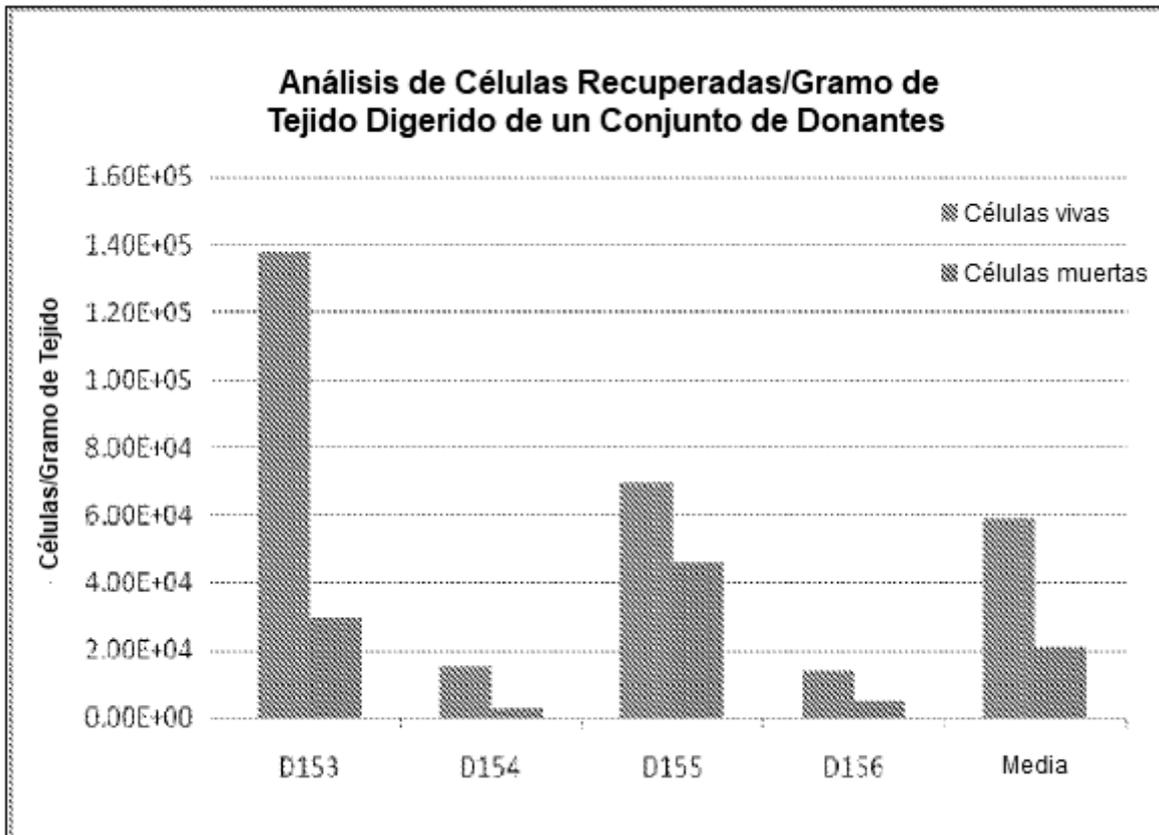


FIGURA 5

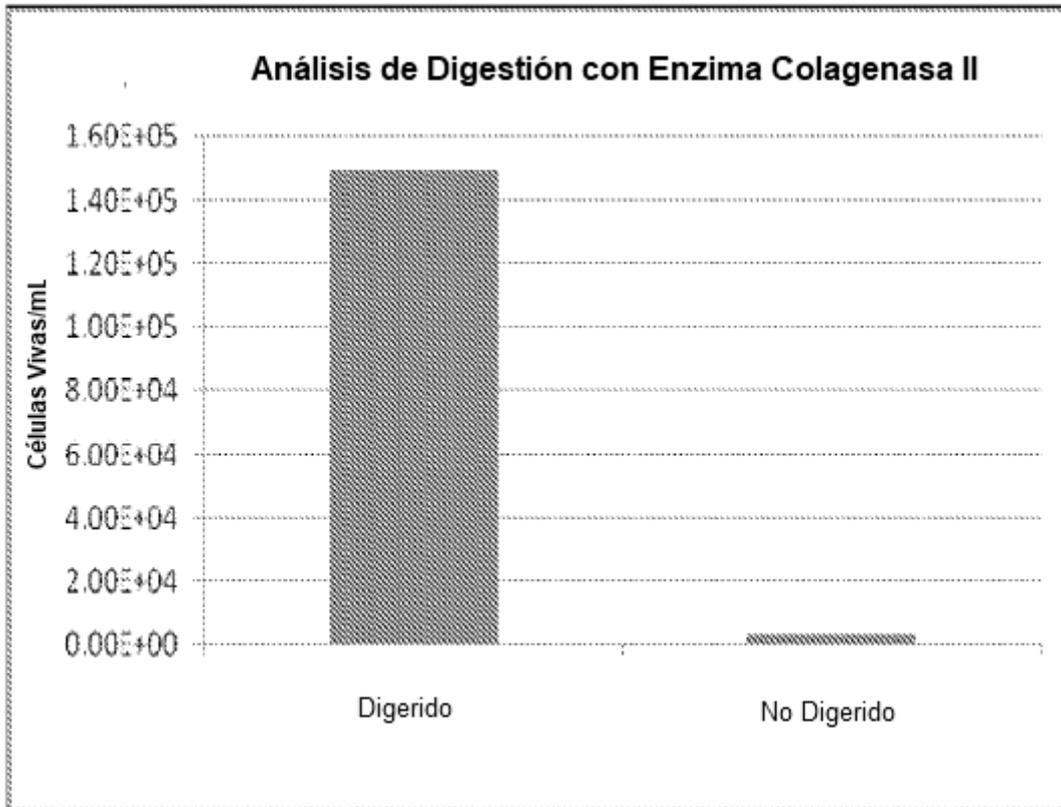


FIGURA 6

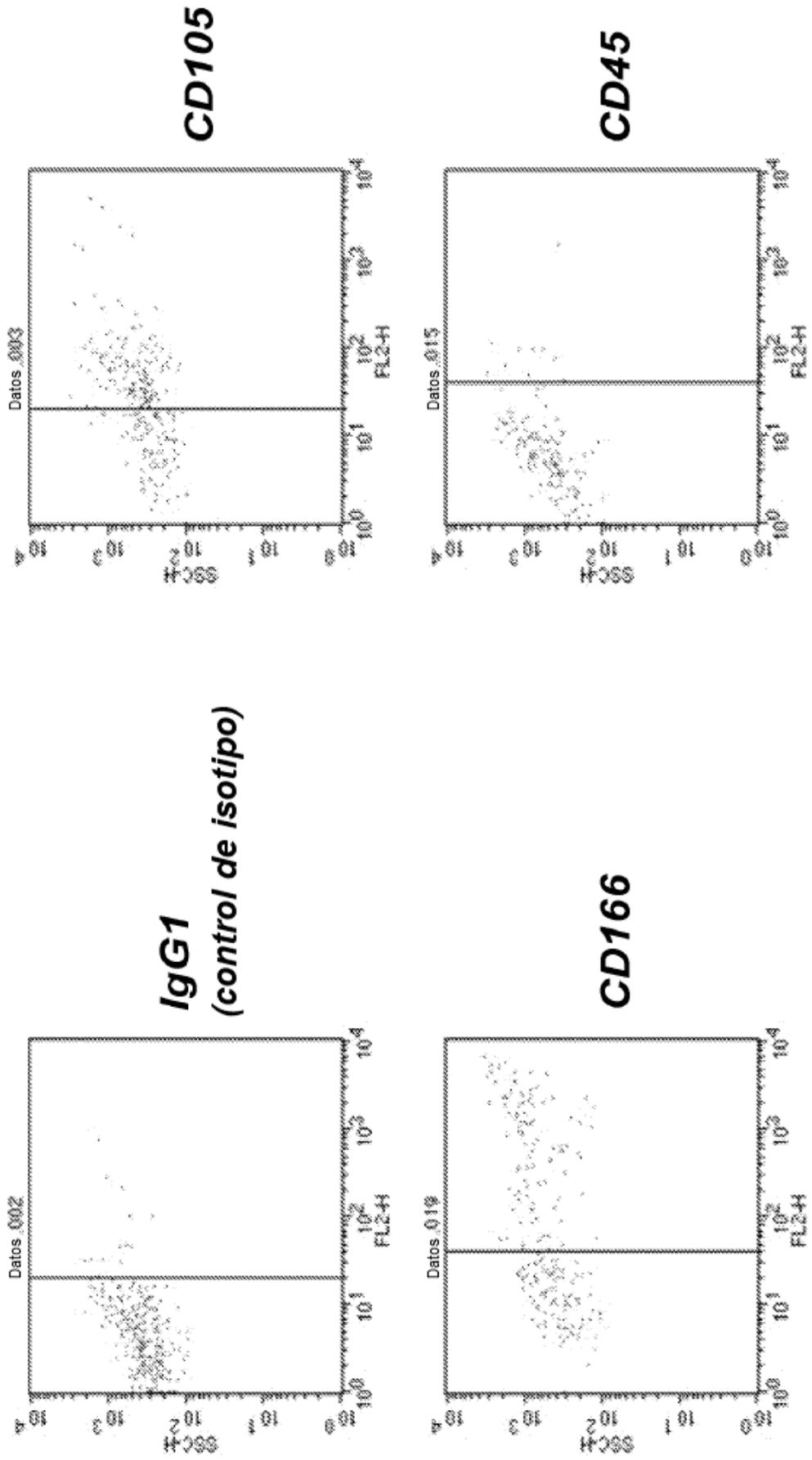


FIGURA 7

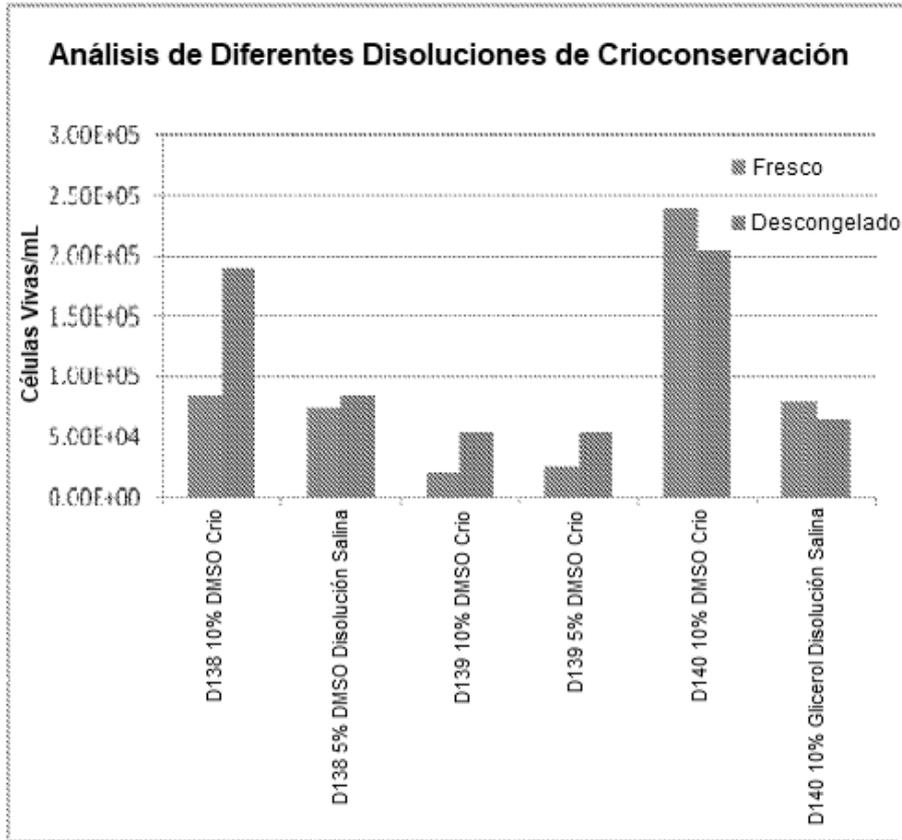


FIGURA 8

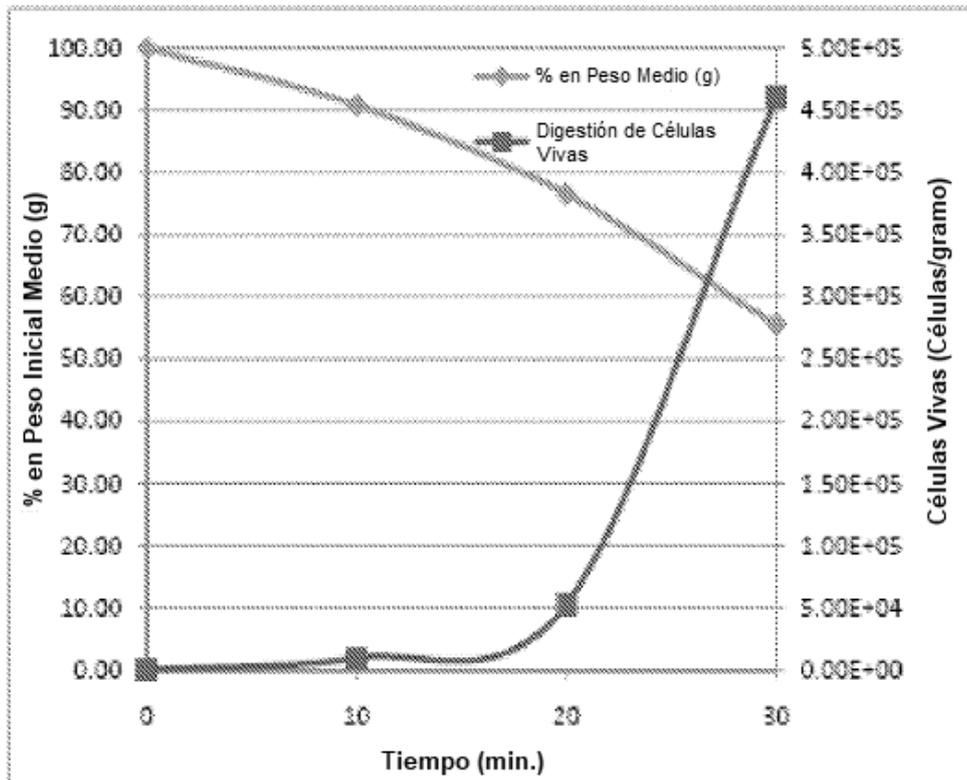


FIGURA 9

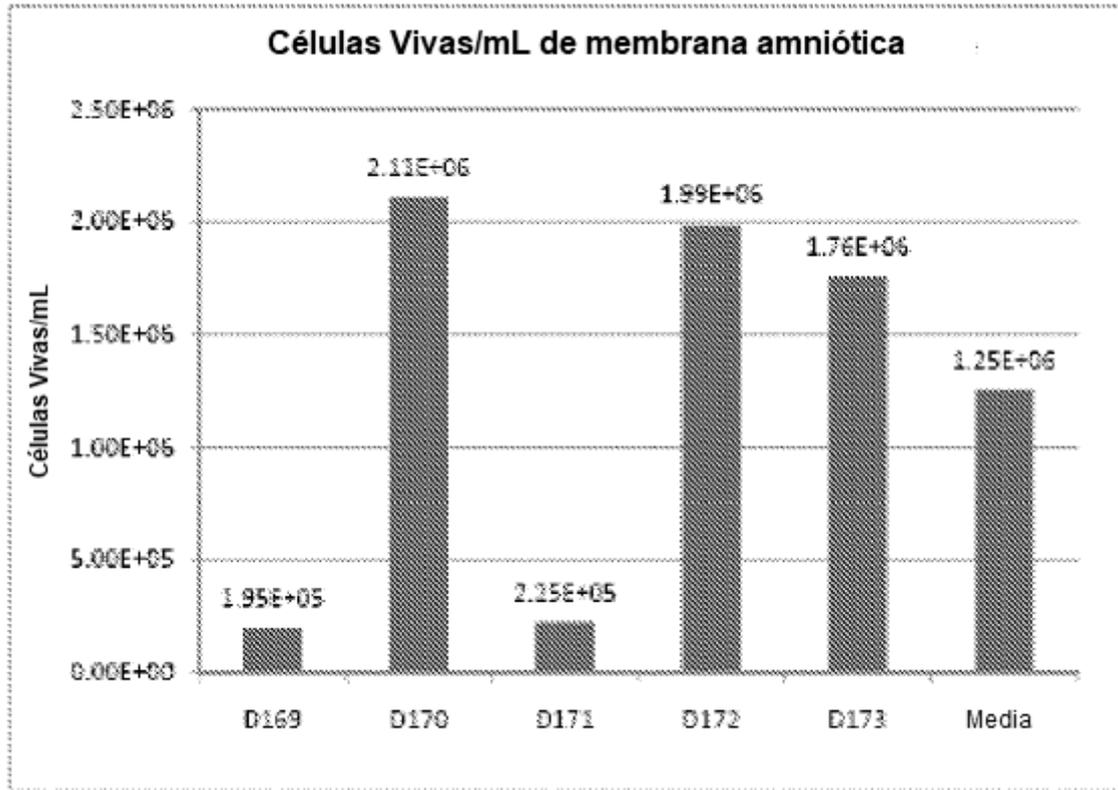


FIGURA 10

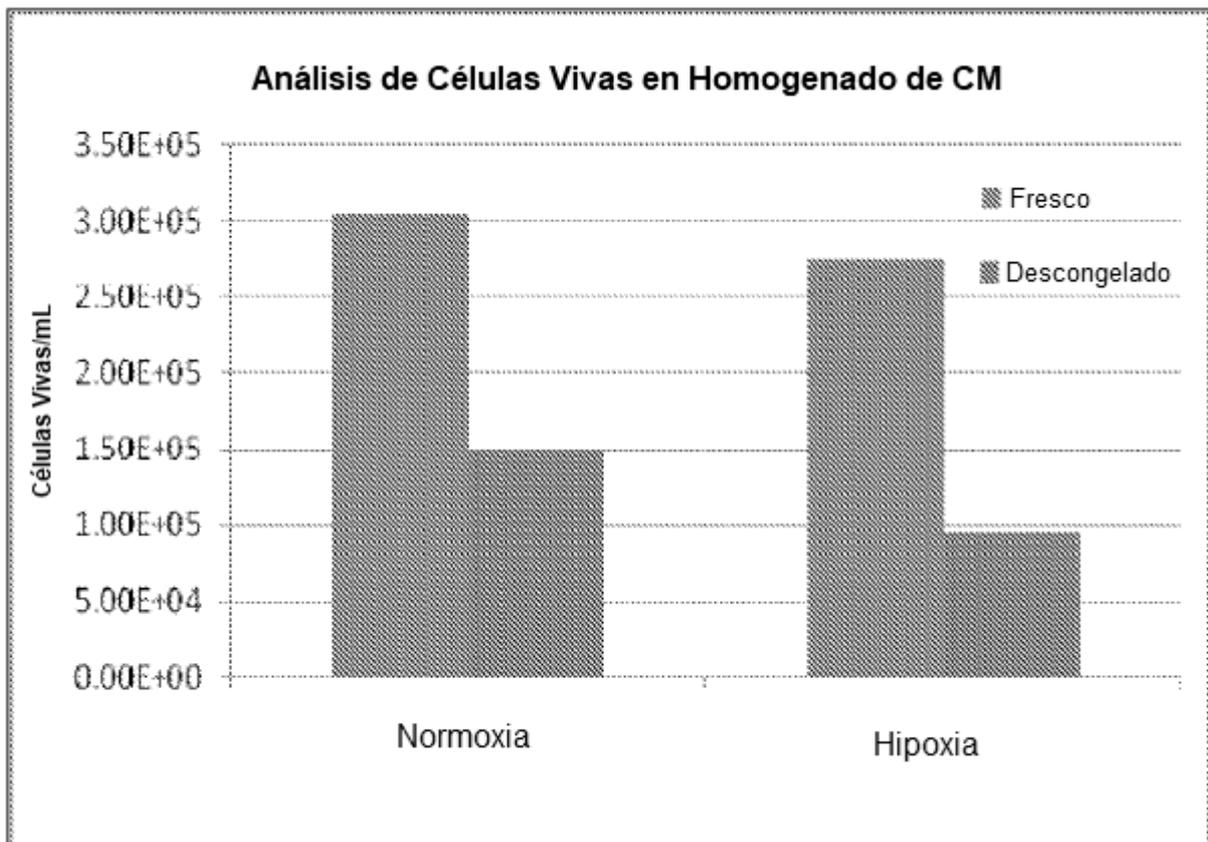


FIGURA 11

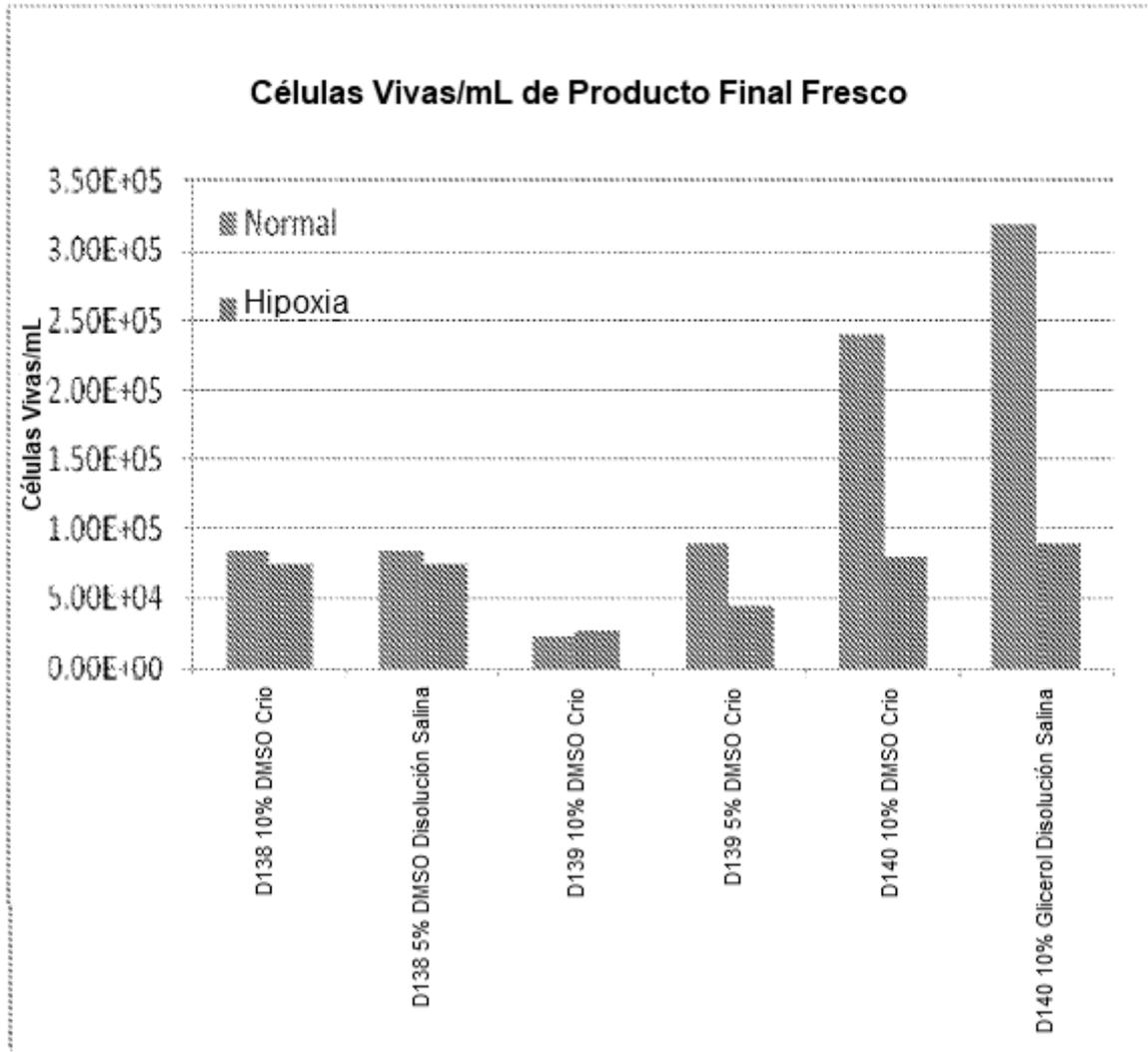


FIGURA 12A

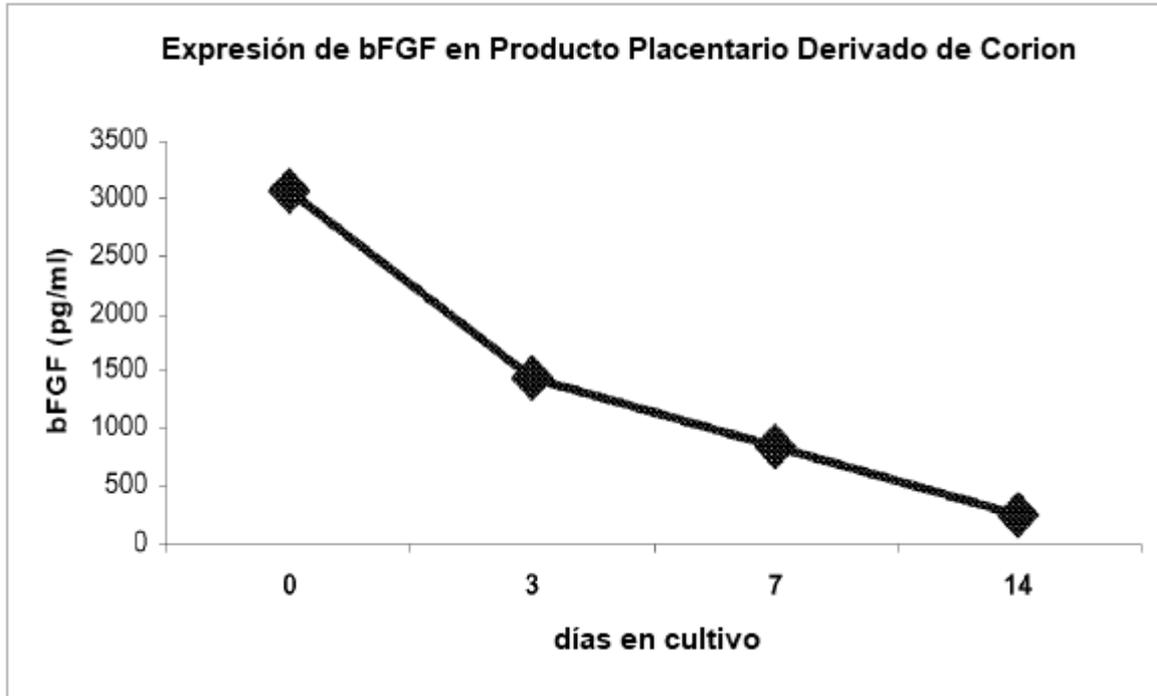


FIGURA 12B

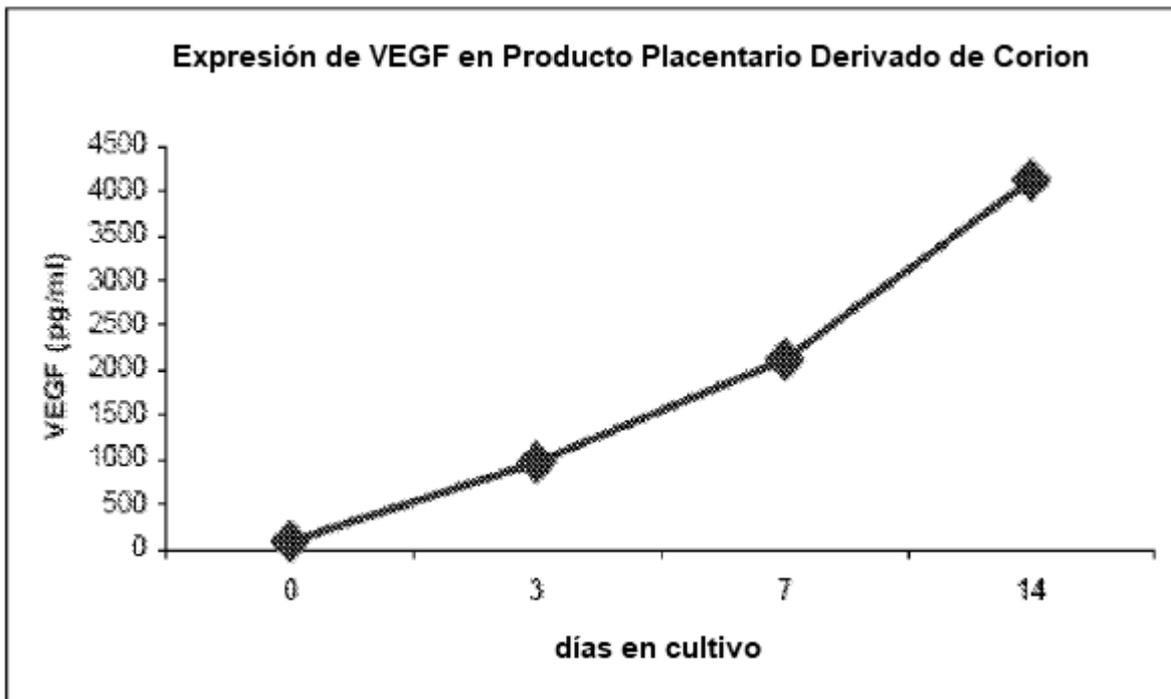


FIGURA 13A

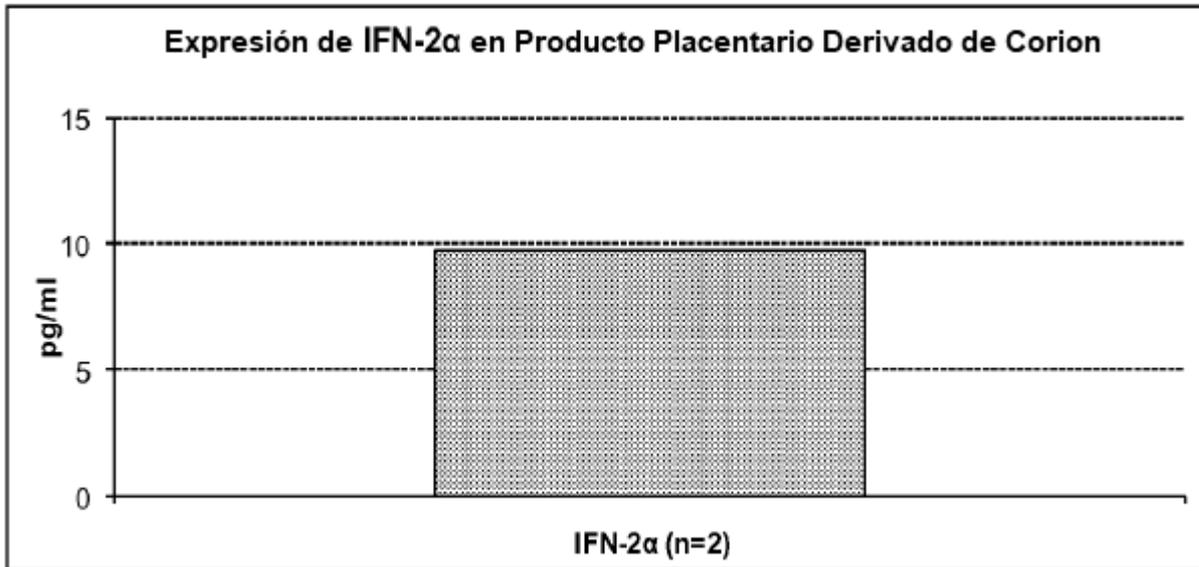


FIGURA 13B

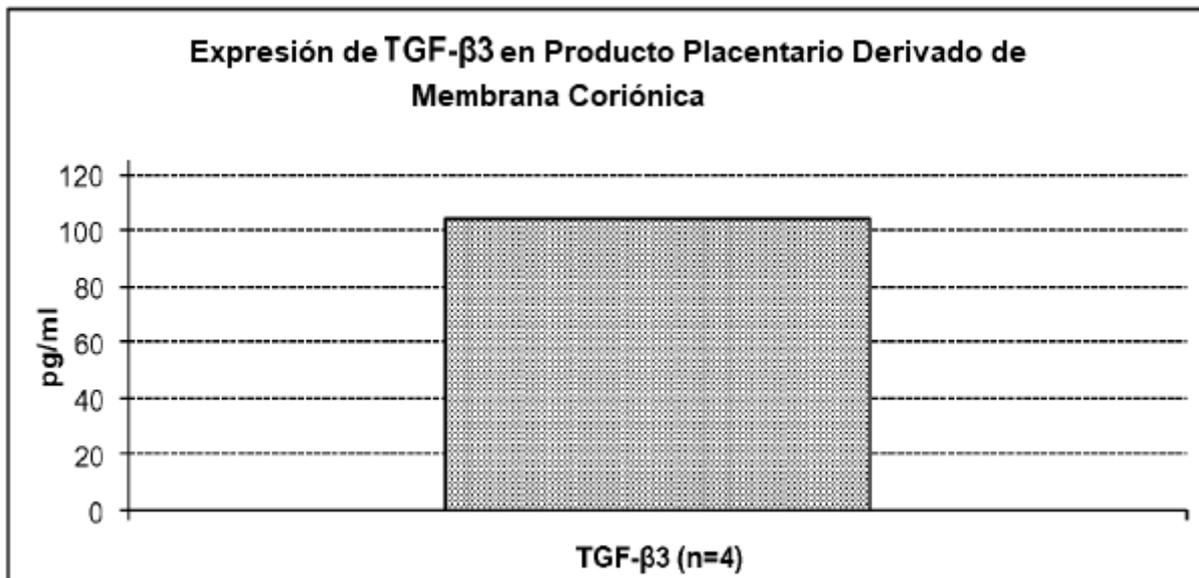


FIGURA 14A

Expresión de proteínas de reparación ósea en producto placentario derivado de corion

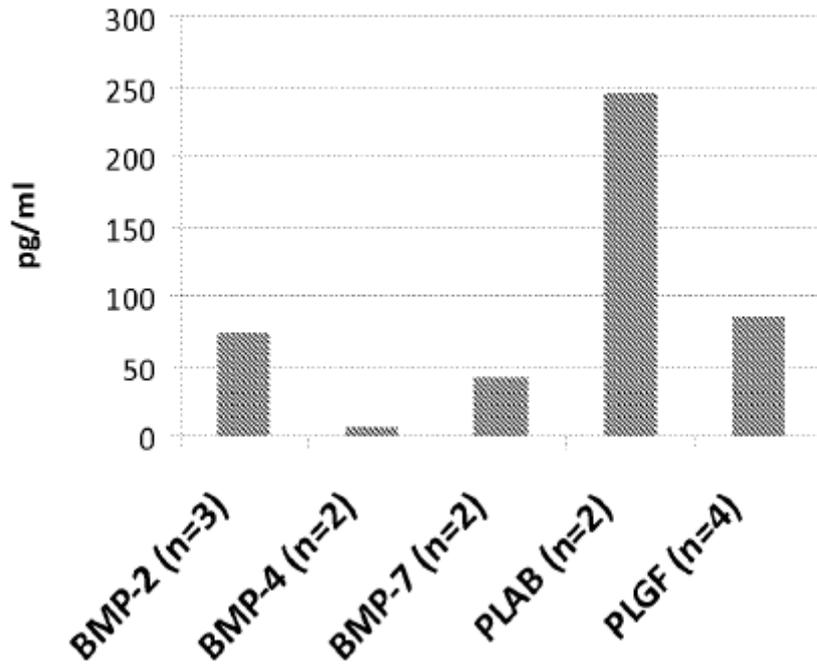


FIGURA 14B

Expresión de IGF-1 en producto placentario derivado de corion

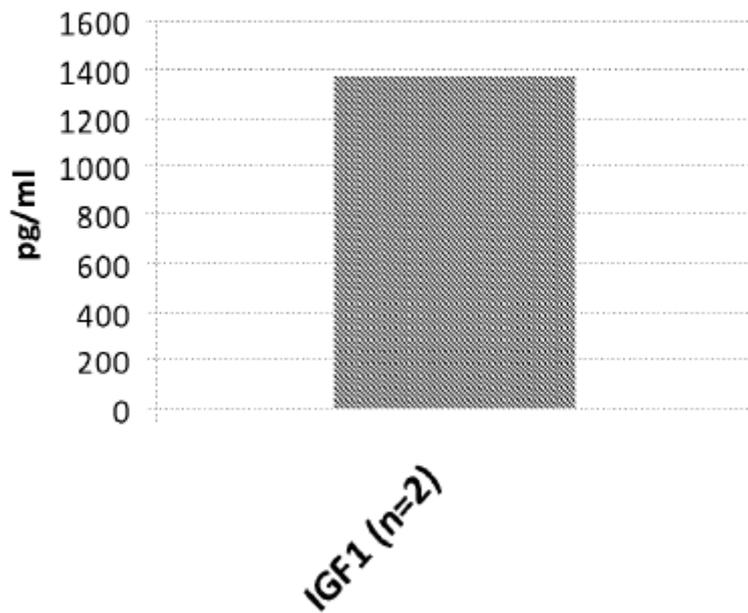


FIGURA 15A

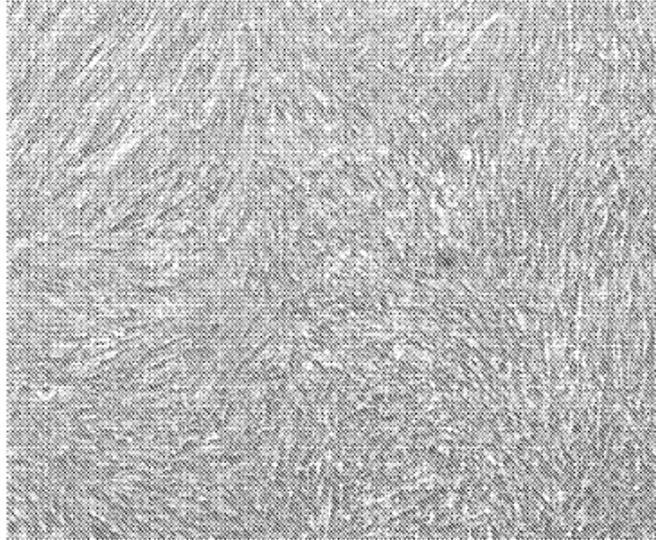


FIGURA 15B

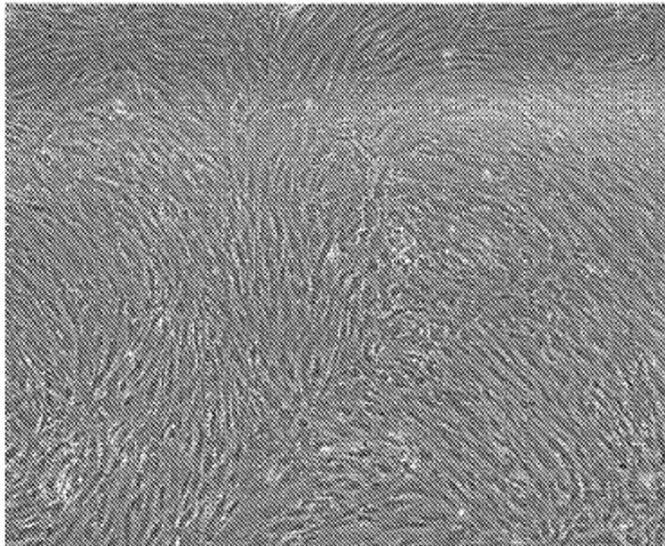


FIGURA 15C

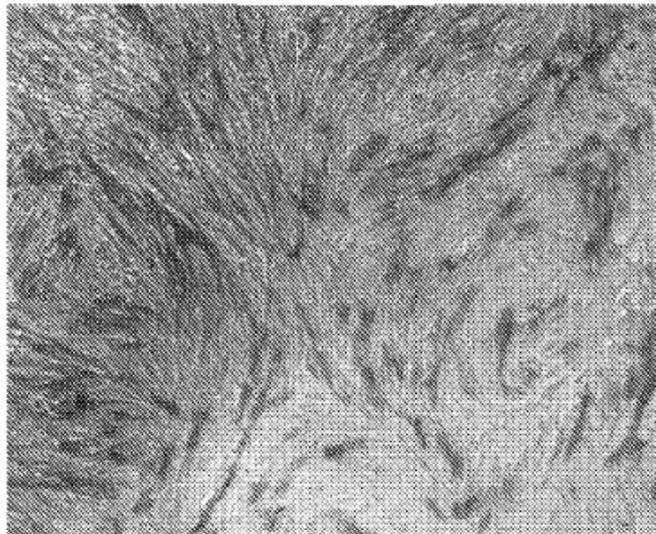


FIGURA 16

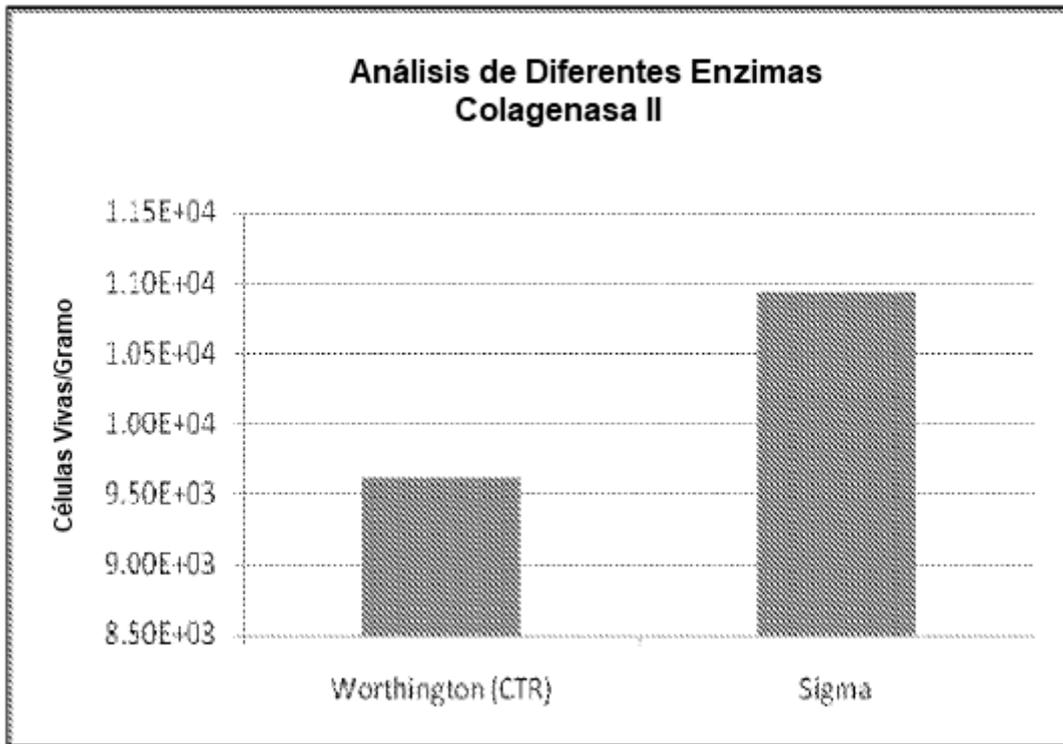


FIGURA 17

