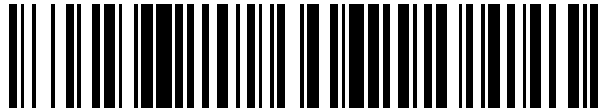


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 466**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)
A01N 1/02 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/57 (2006.01)
A61K 35/50 (2015.01)
C12N 5/073 (2010.01)
A61K 38/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2011 PCT/US2011/025459**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11103446**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2011 E 11745341 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2536824**

54 Título: **Aplicaciones relacionadas con productos de membrana coriónica inmunocompatibles**

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:
25.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TOM, SAMSON;
DANILKOVITCH, ALLA;
YOO, DANA;
JANSEN, TIMOTHY;
KUANG, JIN-QIANG y
MARCONI, JENNIFER MICHELLE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 665 466 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

Aplicaciones relacionadas con productos de membrana coriónica inmunocompatibles

Esta solicitud reivindica prioridad a:

5 la solicitud provisional de EE. UU. con n.º de serie 61/338.464 titulada "Selectively Immunodepleted Chorionic Membranes", presentada el 18 de febrero de 2010 que tiene el n.º de expediente 22924US01,

la solicitud provisional de EE. UU. con n.º de serie 61/338.489 titulada "Selectively Immunodepleted Amniotic Membranes", presentada el 18 de febrero de 2010 que tiene el n.º de expediente 22925US01 y

la solicitud provisional de EE. UU. con n.º de serie 61/369.562 titulada "Therapeutic Products Comprising Vitalized Placental Dispersions" presentada el 30 de julio de 2010 que tiene el n.º de expediente 23498US01.

10 Esta solicitud se está presentando de forma conjunta el 18 de febrero de 2011 con, e incorpora las solicitudes tituladas:

"Methods of Manufacture of Immunocompatible Chorionic Membrane Products",

"Immunocompatible Amniotic Membrane Products",

"Methods of Manufacture of Immunocompatible Amniotic Membrane Products",

15 "Therapeutic Products Comprising Vitalized Placental Dispersions" y

"Methods of Manufacture of Therapeutic Products Comprising Vitalized Placental Dispersions".

CAMPO DE LA INVENCION

20 La presente tecnología se refiere a productos para facilitar la cicatrización de heridas, tales como productos derivados de la membrana placentaria y sustitutos de piel biológica. La presente tecnología se refiere a productos para proteger un tejido lesionado o dañado, o como una cobertura para prevenir adhesiones, para excluir las bacterias, para inhibir la actividad bacteriana o para promover la cicatrización o el crecimiento del tejido. El campo también se refiere a métodos de fabricación y métodos de uso de dichos productos derivados de membrana.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25 Las membranas placentarias frescas o descelularizadas se han usado de forma tópica en aplicaciones quirúrgicas desde al menos 1910 cuando el Johns Hopkins Hospital informó del uso de membrana placentaria para aplicaciones dérmicas. Posteriormente se usaron amnios y corion no separados como sustitutos de la piel para tratar superficies quemadas o ulceradas. Durante la década de 1950 y 1960, Troensegaard-Hansen aplicó membranas amnióticas hervidas a úlceras crónicas en las piernas.

30 La membrana coriónica (MC) humana es una de las membranas que existen durante el embarazo entre el feto en desarrollo y la madre. Se forma por el mesodermo extraembrionario y las dos capas de trofoblasto, y rodea el embrión y otras membranas. Las vellosidades coriónicas surgen del corion, invaden el endometrio y permiten la transferencia de nutrientes desde la sangre materna hasta la sangre fetal.

35 Se han usado MC tanto frescas como congeladas para el tratamiento de cicatrización de heridas. Cuando se usa MC fresca, hay un riesgo aumentado de transmisión de enfermedades. De acuerdo con informes publicados, el tejido placentario fresco, por ejemplo, tejido coriónico, muestra una viabilidad celular de un 100 %, sin embargo, en 28 días de almacenamiento por encima de 0 °C disminuía la viabilidad celular hasta un 15 a un 35 %. La congelación durante un tiempo de 3 semanas reducía la viabilidad celular hasta un 13 a 18 %, independientemente de la temperatura o el medio. Como se cree que la MC es inmunógena, no se ha usado en productos comerciales de cicatrización de heridas.

40 Dos productos de injerto tisular placentario que contienen células vivas, Apligraf y Dermagraft, están actualmente disponibles en el mercado. Tanto Apligraf como Dermagraft comprenden células cultivadas *ex vivo*. Ni Apligraf ni Dermagraft comprenden células madre. Además, ni Apligraf ni Dermagraft comprenden la proteína 1 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina (IGFBP-1) ni adiponectina, que son factores clave en el proceso natural de cicatrización de heridas. Además, ni Apligraf ni Dermagraft muestran una relación de proteasa a inhibidor de proteasa favorable para la cicatrización de heridas. Como la cicatrización de las heridas es un proceso biológico multifactorial, se necesitan muchos factores para tratar apropiadamente una herida; los productos que tienen poblaciones celulares no naturales son menos capaces de cicatrizar heridas respecto a un producto que tenga una población óptima de células que represente la diversidad natural. Representaría un avance en la técnica proporcionar un sustituto de piel biológica derivado del corion que comprenda una población de células que represente la diversidad natural de factores incluyendo, por ejemplo, factores de crecimiento y citocinas.

50

Apligraf es un sustituto de piel viva, bicapa, fabricado usando queratinocitos y fibroblastos de prepucio neonatal con colágeno bovino de tipo I. Como se usa en esta solicitud, Apligraf se refiere al producto disponible para venta comercial en noviembre de 2009.

5 Dermagraft consiste en fibroblastos humanos crioconservados derivados de tejido de prepucio de recién nacido sembrados en matriz extracelular. De acuerdo con el prospecto del producto, Dermagraft requiere tres etapas de lavado antes de su uso, lo que limita la implementación práctica de Dermagraft como un sustituto de piel respecto a productos que requieren menos de tres etapas de lavado. Como se usa en esta solicitud, Dermagraft se refiere al producto disponible para venta comercial en noviembre de 2009.

10 Los sustitutos de piel de bioingeniería tales como Apligraf y Dermagraft no proporcionan el mejor potencial para la cicatrización de heridas, porque comprenden composiciones celulares subóptimas y, por lo tanto, no proporcionan una cicatrización apropiada de las heridas. Por ejemplo, ni Apligraf ni Dermagraft comprenden células madre y, como resultado, la relación entre los diferentes factores secretados por las células no posibilita la cicatrización eficaz de las heridas. Además, algunos factores que son importante para la cicatrización de las heridas, incluyendo EGF, IGFBP1 y adiponectina están ausentes tanto en Apligraf como en Dermagraft. Además, algunos factores, 15 incluyendo MMP y TIMP, están presentes en proporciones que difieren enormemente de las proporciones encontradas en el proceso natural de cicatrización de heridas; esta diferencia altera significativamente, entre otras cosas, las rutas de citocinas inflamatorias secuencia arriba, que a su vez permite microentornos subóptimos en el sitio de cicatrización. Los autores de la presente invención han identificado una necesidad de desarrollo de productos de membrana coriónica que se parezcan mucho más al tejido natural.

20 Paquet-Fifield et al. informan de que las células madre mesenquimatosas y los fibroblastos son importantes para la cicatrización de heridas (J Clin Invest, 2009, 119: 2795). Aún no se ha descrito ningún producto que comprenda células madre mesenquimatosas y fibroblastos.

El documento WO 2005/007835 se refiere a membranas coriónicas sembradas con células exógenas a la membrana coriónica.

25 Tanto las MMP como las TIMP están entre los factores que son importantes para la cicatrización de heridas. Sin embargo, la expresión de estas proteínas debe estar muy regulada y coordinada. El exceso de MMP frente a TIMP es un marcador de una mala cicatrización de heridas crónicas (Liu et al., Diabetes Care, 2009, 32: 117; Mwaura et al., Eur J Vasc Endovasc Surg, 2006, 31: 306; Trengove et al., Wound Rep Reg, 1999, 7: 442; Vaalamo et al., Hum Pathol, 1999, 30: 795).

30 Se conoce la $\alpha 2$ -macroglobulina como una proteína plasmática que inactiva las proteinasas de las 4 clases mecanicistas: serina proteinasas, cisteína proteinasas, aspartil proteinasas y metaloproteiniasas (Borth et al., FASEB J, 1992,6: 3345; Baker et al., J Cell Sci, 2002, 115:3719). Otra función importante de esta proteína es servir como un depósito de citocinas y factores de crecimiento, cuyos ejemplos incluyen TGF, PDGF y FGF (Asplin et al., Blood, 2001, 97: 3450; Huang et al., J Biol Chem, 1988, 263: 1535). En las heridas crónicas como las 35 úlceras diabéticas o las úlceras varicosas, la presencia de una elevada cantidad de proteasas da lugar a una rápida degradación de los factores de crecimiento y retarda la cicatrización de heridas. Por tanto, un sustituto de piel de membrana placentaria que comprenda $\alpha 2$ -macroglobulina constituiría un avance en la técnica.

El bFGF modula una diversidad de procesos celulares, incluyendo la angiogénesis, la reparación de tejidos y la cicatrización de heridas (Presta et al., 2005, Reuss et al., 2003 y Su et al., 2008). En los modelos de cicatrización 40 de heridas, se ha demostrado que el bFGF aumenta el cierre de la herida y potencia la formación de vasos en el sitio de la herida (Greenhalgh et al., 1990).

Un ensayo de migración celular *in vitro* es importante para evaluar el potencial de cicatrización de heridas de un sustituto de piel. El proceso de cicatrización de heridas es muy complejo e implica una serie de eventos estructurados controlados por los factores de crecimiento (Goldman, Adv Skin Wound Care, 2004, 1:24). Estos 45 eventos incluyen aumento de la vascularización, infiltración por células inmunitarias inflamatorias y aumentos en la proliferación celular. Las fases iniciales de la cicatrización de las heridas giran en torno a la capacidad de las células individuales de concentrarse en la herida y migrar a la zona lesionada para cerrar la zona de la herida y reconstruir el tejido adyacente. Los queratinocitos son el tipo celular principal de la capa epitelial. Tras la estimulación apropiada, quedan implicados en el proceso de cicatrización de heridas (Pastar et al., 2008 y Bannasch et al., 2000). Específicamente, proliferan y migran en la zona de la herida para promover la cicatrización. 50 Un ensayo que pueda evaluar el potencial de cicatrización de las heridas de los sustitutos de piel examinando la correlación entre la migración celular y la cicatrización de las heridas representaría un avance en la técnica.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un producto placentario farmacéuticamente aceptable.

55 Un producto placentario de acuerdo con la presente invención comprende una membrana coriónica inmunocompatible en un medio de crioconservación (opcionalmente crioconservado) y células terapéuticas viables que son originarias de la membrana coriónica y que son una o más de células madre mesenquimatosas ("MSC"),

fibroblastos y células estromales.

En algunas realizaciones, el producto placentario comprende además una membrana amniótica que está desvitalizada de forma selectiva.

5 En esta ocasión se proporciona un producto placentario que tiene una cantidad reducida de forma selectiva de sustancialmente todas las células inmunógenas.

En esta ocasión se proporciona un producto placentario que no contiene células cultivadas *ex vivo*.

En esta ocasión se proporciona un producto placentario que comprende al menos uno de factor de crecimiento epidérmico, IGFBP1 y adiponectina.

10 Opcionalmente, los factores terapéuticos incluyen uno o más de IGFBP1, adiponectina, α 2-macroglobulina, bFGF y EGF. Opcionalmente, los factores terapéuticos incluyen MMP-9 y TIMP1, en donde la relación de MMP-9:TIMP1 es de aproximadamente 7 a aproximadamente 10. Opcionalmente, los factores terapéuticos incluyen IGFBP1, adiponectina, α 2-macroglobulina, bFGF, EGF, MMP-9 y TIMP1. Opcionalmente, los factores terapéuticos incluyen IGFBP1, adiponectina, α 2-macroglobulina, bFGF, MMP-9 y TIMP1, en donde la relación de MMP-9:TIMP1 es de aproximadamente 7 a aproximadamente 10. Opcionalmente, el factor terapéutico está presente en una cantidad sustancial en comparación con la membrana placentaria humana no procesada equivalente. Opcionalmente, cada realización de producto placentario opcionalmente está desprovista de células cultivadas *ex vivo*.

20 La presente invención también proporciona un método de fabricación de un producto placentario, que comprende: obtener una placenta, en donde la placenta comprende una membrana coriónica, reducir selectivamente la inmunogenicidad de la placenta y crioconservar la placenta, proporcionando de ese modo un producto placentario. De acuerdo con la presente invención, la etapa de reducción selectiva comprende eliminar las células inmunógenas (por ejemplo, macrófagos CD14+ y/o células del trofoblasto) y/o factores inmunógenos (por ejemplo, TNF α). Opcionalmente, la etapa de reducción selectiva comprende inmunorreducir selectivamente la placenta, por lo que el producto placentario se purifica de las células inmunógenas y/o los factores inmunógenos. Opcionalmente, la etapa de reducción selectiva comprende eliminar una capa de células del trofoblasto, por ejemplo, por tratamiento con una enzima digestiva y/o eliminación mecánica. Opcionalmente, la etapa de reducción selectiva comprende eliminar los macrófagos CD14+ por un crioproceso en donde el producto placentario se incuba durante un periodo de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 30-60 min) a una temperatura por encima de la congelación (por ejemplo, a 2-8 °C), y después congelarlo, por lo que los macrófagos CD 14+ se eliminan selectivamente respecto a las células terapéuticas.

30 La presente invención también proporciona un método de cribado de un producto placentario para tratamiento, que comprende ensayar el producto placentario para la inmunogenicidad y/o el valor terapéutico. Opcionalmente, la etapa de ensayo del producto placentario para la inmunogenicidad comprende una reacción de linfocitos mezclados (MLR) y/o secreción de factor de necrosis tumoral (TNF)- α inducida por lipopolisacárido (LPS).

35 Opcionalmente, la etapa de ensayo del producto placentario para el valor terapéutico comprende ensayar el producto placentario para la inducción de migración celular.

40 La presente invención también proporciona un producto placentario para su uso en el tratamiento de un sujeto, que comprende administrar un producto placentario al sujeto. Opcionalmente, la etapa de administración comprende aplicar el producto placentario a una herida, por ejemplo, aplicar de forma tópica el producto placentario a una herida de la piel. En una realización, un producto placentario se usa en una cirugía de tendón o ligamento para promover la cicatrización de un tendón o ligamento.

Los autores de la presente invención han identificado una necesidad de desarrollo de productos de membrana coriónica que comprendan al menos uno de IGFBP1 y adiponectina, que proporcionan propiedades superiores de cicatrización de las heridas.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 representa las tasas de congelación de diversos métodos de congelación.

La figura 2 representa la recuperación de células del proceso como una función del volumen de crio.

La figura 3 representa la recuperación de células del proceso como una función del tiempo de refrigeración.

La figura 4 muestra imágenes representativas de la tinción Live/Dead de la capa epitelial de membrana amniótica fresca.

50 La figura 5 representa las concentraciones de IL-2sR de diversos intermedios de fabricación.

La figura 6 representa las concentraciones de IL-2sR de diversos intermedios de fabricación.

La figura 7 representa las concentraciones de TNF α de la secreción inducida por LPS por tejidos placentarios.

La figura 8 muestra imágenes representativas de la tinción Live/Dead de la capa epitelial de membrana amniótica fresca.

La figura 9 representa una correlación entre la liberación de IL-2sR y la cantidad de células CD45+.

5 La figura 10 representa una correlación entre la cantidad de células CD45+ presentes en suspensiones celulares derivadas de amnios y la inmunogenicidad en MLR *in vitro*.

La figura 11 representa la expresión de EGF (A), IGFBP1 (B) y adiponectina (C) en membrana amniótica y/o coriónica.

La figura 12 representa la expresión de IFN-2 α y TGF- β 3 en homogeneizados de membrana amniótica.

10 La figura 13 representa la expresión de BMP-2, BMP-4, PLAB, PIGF (A) e IGF-1 (B) en homogeneizados de membrana amniótica.

La figura 14 representa la relación de MMP a TIMP en diversos productos de membrana.

La figura 15 representa los niveles de bFGF en membrana amniótica y coriónica (CM).

15 La figura 16 representa la expresión representativa de bFGF en muestras de tejido coriónico derivadas de dos donantes diferentes de placenta.

La figura 17 representa un esquema del ensayo de migración celular.

La figura 18 representa los resultados del ensayo de migración celular de diversas preparaciones de membrana.

La figura 19 representa la expresión del factor de crecimiento y de adiponectina en extractos proteínicos de diversas preparaciones de membrana.

20 Descripción detallada de la invención

Como se emplea en esta memoria, se aplican las siguientes definiciones:

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

25 "hCMSC": significa células estromales de membrana coriónica humana. Las hCMSC en general son positivas para CD73, CD70, CD90, CD105 y CD166; negativas para CD45 y CD34. Las hCMSC se diferencian en linajes mesodérmicos (osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas).

30 "Reducción selectiva de inmunogenicidad" o "reducción selectiva de células o factores inmunógenos" o "reducción selectiva" significa un producto placentario que retiene las células terapéuticas vivas y/o retiene la eficacia terapéutica para el tratamiento de una lesión tisular, pero está libre, sustancialmente libre o tiene una reducción de al menos un tipo de célula inmunitaria (por ejemplo, macrófagos CD14+, células del trofoblasto y/o células derivadas de tejido vascular) y/o factor inmunógeno que de lo contrario están presentes en una placenta o membrana coriónica natural.

"MSC" significa células madres mesenquimatosas e incluyen fetales, neonatales, adultas o posnatales. Las "MSC" incluyen MSC coriónicas (CMSC). Las MSC generalmente expresan uno o más de CD73, CD90, CD105 y CD166.

35 "Células originarias" significa células que son originarias, residentes o endógenas de la membrana placentaria, es decir, células que no se añaden de forma exógena a la membrana placentaria.

"Factores naturales" significa factores de la membrana placentaria que son originarios, residentes o endógenos de la membrana placentaria, es decir, factores que no se añaden de forma exógena a la membrana placentaria.

"Productos placentarios" significa los presentes productos placentarios descritos en la presente memoria.

40 "Sustancialmente libre" significa presente en únicamente una cantidad insignificante o no presente en absoluto. Por ejemplo, cuando una célula es abundante en un mínimo de aproximadamente un 20 % o menos de aproximadamente un 10 % o menos de aproximadamente un 1 % de la cantidad en una muestra no procesada.

45 "Cantidad sustancial" de un elemento de la presente invención, por ejemplo, factores naturales, factores terapéuticos o reducción selectiva, significa un valor de al menos aproximadamente un 2 % o al menos un 10 % en comparación con una muestra de membrana fresca, no crioconservada, no procesada. Una cantidad sustancial puede ser opcionalmente de al menos aproximadamente un 50 %.

"Células terapéuticas" o "células beneficiosas" significa células estromales, MSC y/o fibroblastos.

"Factores terapéuticos" significa factores derivados de placenta o membrana coriónica que promueven la cicatrización de heridas. Los ejemplos incluyen IGFBP1, adiponectina, α 2-macroglobulina y/o bFGF. Otros ejemplos incluyen MMP-9 y TIMP1.

5 "Células estromales" se refiere a una población mezclada de células presentes (opcionalmente en proporciones naturales) compuesta de células madre mesenquimatosas neonatales y fibroblastos neonatales. Tanto las células madre mesenquimatosas neonatales como los fibroblastos neonatales son inmunoprivilegiadas; ninguna expresa proteínas superficiales presentes en tipos celulares inmunógenos.

10 En algunas realizaciones, la presente tecnología describe productos placentarios para uso clínico, incluyendo el uso en la cicatrización de heridas tales como úlceras diabéticas en los pies, úlceras varicosas en las piernas y quemaduras. El proceso de fabricación opcionalmente elimina esencialmente todas las células potencialmente inmunógenas de la membrana placentaria, conservando al mismo tiempo las células específicas que desempeñan una función importante en la cicatrización de heridas.

15 En algunas realizaciones, la presente tecnología describe un producto placentario que está desvitalizado de forma selectiva. En esta ocasión se proporciona un producto placentario que tiene una cantidad reducida de forma selectiva de sustancialmente todas las células inmunógenas. En esta ocasión se proporciona un producto placentario que no contiene células cultivadas *ex vivo*. En esta ocasión se proporciona un producto placentario que comprende al menos uno de IGFBP1 y adiponectina. En esta ocasión se proporciona un producto placentario que comprende IGFBP1. En esta ocasión se proporciona un producto placentario que comprende adiponectina.

20 En algunas realizaciones, la presente tecnología describe un método de crioconservación de un producto placentario que conserva la viabilidad de células beneficiosas específicas que son la fuente principal de factores para promover la cicatrización para el proceso de cicatrización de heridas, reduciendo de forma selectiva al mismo tiempo las células inmunógenas (por ejemplo, eliminándolas o haciendo que sean no inmunógenas) de las membranas coriónicas.

25 En algunas realizaciones, la presente tecnología describe un bioensayo para ensayar la inmunogenicidad de los productos placentarios fabricados.

En algunas realizaciones, la presente tecnología describe un producto placentario que muestra una relación de MMP:TIMP comparable con la mostrada *in vivo*. Los autores de la presente invención han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que muestren una relación de MMP-9 y TIMP1 de aproximadamente 7-10 a uno.

30 En algunas realizaciones, la presente tecnología describe un producto placentario que comprende α 2-macroglobulina.

Los autores de la presente invención han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que comprendan α 2-macroglobulina.

35 En esta ocasión se proporciona un producto placentario que inactiva sustancialmente todas las serina proteinasas, cisteína proteinasas, aspartil proteinasas y metaloproteiniasas presentes en la membrana coriónica. En esta ocasión se proporciona un producto placentario que inactiva sustancialmente todas las serina proteinasas presentes en la membrana coriónica. En esta ocasión se proporciona un producto placentario que inactiva sustancialmente todas las cisteína proteinasas presentes en la membrana coriónica. En esta ocasión se proporciona un producto placentario que inactiva sustancialmente todas las aspartil proteinasas presentes en la membrana coriónica. En esta ocasión se proporciona un producto placentario que inactiva sustancialmente todas las metaloproteiniasas presentes en la membrana coriónica.

40 En algunas realizaciones, la presente tecnología describe un producto placentario que comprende bFGF, opcionalmente en una cantidad sustancial.

45 En algunas realizaciones, la presente tecnología describe un producto placentario que muestra una relación de proteasa a inhibidor de proteasa favorable para la cicatrización de heridas, opcionalmente en una cantidad sustancial.

En algunas realizaciones, la presente tecnología describe un ensayo de migración celular que puede evaluar el potencial de cicatrización de heridas de un producto placentario.

50 La IGFBP1 y la adiponectina están entre los factores que son importantes para la cicatrización de heridas. La evaluación de proteínas derivadas de productos placentarios preparados de acuerdo con la tecnología descrita en la presente revela que bFGF es uno de los factores principales secretados en cantidades sustancialmente mayores por la membrana coriónica. Además, la importancia de EGF para la cicatrización de heridas junto con los altos niveles de bFGF detectados en las membranas coriónicas descritas en la presente respaldan la selección de bFGF como un marcador de potencia para la evaluación de productos de membrana fabricados para uso clínico

55 conforme a la presente descripción.

- La presente tecnología describe un procedimiento de crioconservación para productos placentarios que reduce de forma selectiva las células inmunógenas de las membranas coriónicas y conserva la viabilidad de otras células beneficiosas (incluyendo al menos una de células madre mesenquimatosas y fibroblastos en algunas realizaciones y todas las células madre mesenquimatosas y fibroblastos en algunas realizaciones) que son la fuente principal de factores para promover la cicatrización. Durante el desarrollo de la metodología de crioconservación para membranas coriónicas, los autores de la presente solicitud evaluaron los parámetros clave de crioconservación, incluyendo el volumen de solución crioconservante, el efecto del equilibrado del tejido antes de la congelación y las tasas de refrigeración para procedimientos de congelación.
- Los productos placentarios, su utilidad y su inmunocompatibilidad se potencian sorprendentemente por reducción del trofoblasto materno y la eliminación selectiva de macrófagos fetales CD14+. La inmunocompatibilidad puede demostrarse por cualquier medio habitualmente conocido por los expertos en la técnica, dicha demostración puede realizarse por la reacción de linfocitos mezclados (MLR) y por la secreción de factor de necrosis tumoral (TNF)- α inducida por lipopolisacárido (LPS).
- Los presentes productos placentarios contienen bFGF, opcionalmente a una concentración sustancial.
- Los presentes productos placentarios opcionalmente secretan factores que estimulan la migración celular y/o la cicatrización de heridas. La presencia de dichos factores se puede demostrar por cualquier método aceptado de forma habitual. Opcionalmente, los factores están en una cantidad sustancial.
- Por ejemplo, existen ensayos de cicatrización de heridas disponibles en el mercado (Cell Biolabs) y la migración celular puede evaluarse por línea celular (HMVEC, Lonza Inc.). En una realización, el medio acondicionado de los presentes productos placentarios potencia la migración celular.
- Los productos placentarios descritos en la presente memoria son útiles en el tratamiento de varias heridas, incluyendo: reparación de tendones, reparación de cartílagos (por ejemplo, cóndilo femoral, meseta tibial), remplazo de LCA en la superficie de contacto del túnel/hueso, aumento de tejido dental, fístulas (por ejemplo, enfermedad de Crohn, sonda G, traqueoesofágica), pérdida de tejido en las barreras de adhesión (por ejemplo, reparación del tabique nasal, reparación de la pared vaginal, reparación de la pared abdominal, resección de un tumor),
- heridas de la dermis (por ejemplo, quemaduras de grosor parcial, necrólisis epidérmica tóxica, epidermolísis ampollosa, piodermia gangrenosa, úlceras, por ejemplo, úlceras diabéticas (por ejemplo, en el pie), úlceras venosas en las piernas), heridas quirúrgicas, reparación de hernias, reparación de tendones, reparación de la vejiga, remplazo del perostio, queloides, laceraciones en los órganos, defectos epiteliales y reparación o remplazo de una membrana timpánica.
- Los productos placentarios descritos en la presente memoria muestran una o más de las siguientes propiedades beneficiosas para el proceso de cicatrización de las heridas:
- a. cantidad aproximada de células por cm^2 que es de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 200.000,
 - b. grosor de aproximadamente 40 a aproximadamente 400 μm ,
 - c. una membrana basal delgada,
 - d. baja inmunogenicidad,
 - e. crioconservada/crioconservable y
 - f. células estromales de la membrana coriónica human (hCMSC).
- Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que no contengan células cultivadas *ex vivo*.
- Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que comprendan IGFBP1.
- Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que comprendan adiponectina.
- Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que muestren una relación de proteasa a inhibidor de proteasa favorable para la cicatrización de heridas.
- Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de un método de crioconservación de productos placentarios que conserve la viabilidad de células específicas que son otras

células beneficiosas que son la fuente principal de factores para promover la cicatrización para el proceso de cicatrización de heridas, reduciendo de forma selectiva al mismo tiempo las células inmunógenas de las membranas coriónicas.

5 Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de un bioensayo para ensayar la inmunogenicidad de productos placentarios fabricados.

Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que muestren una relación de MMP a TIMP comparable a la mostrada *in vivo*. Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que muestren una relación de MMP-9 y TIMP1 de aproximadamente 7-10 a uno.

10 Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que comprendan α 2-macroglobulina.

Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que inactiven las serina proteinasas, cisteína proteinasas, aspartil proteinasas y metaloproteinazas. Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que inactiven las serina proteinasas. Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que inactiven las cisteína proteinasas. Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que inactiven las aspartil proteinasas. Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que inactiven las metaloproteinazas.

20 Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de productos placentarios que comprendan bFGF.

Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de un ensayo de migración celular para evaluar el potencial de productos de membrana placentaria.

25 Los autores de la presente invención en esta ocasión han identificado una necesidad de desarrollo de un producto placentario para la cicatrización de heridas que comprenda células madre mesenquimatosas y fibroblastos.

Producto placentario

Visión de conjunto

30 Una realización de la presente invención proporciona un producto placentario que comprende un medio de criopreservación y una membrana coriónica, en donde la membrana coriónica comprende células originarias terapéuticas viables y factores terapéuticos naturales, y en donde el medio de criopreservación comprende una cantidad criopreservante de un criopreservante. De acuerdo con esta realización, la membrana coriónica está sustancialmente libre de al menos uno o 2 o 3 tipos celulares inmunógenos, tales como: células del trofoblasto, macrófagos CD14+ y células derivadas de tejido vascularizado.

35 En una realización, la membrana coriónica comprende una o más capas que muestran la arquitectura de la membrana coriónica natural (por ejemplo, no se ha homogeneizado o tratado con colagenasa).

En una realización, el producto placentario es adecuado para su aplicación dérmica a una herida.

40 Con los contenidos proporcionados en la presente memoria, los expertos en la técnica en esta ocasión pueden producir los presentes productos placentarios. La presente descripción proporciona métodos de fabricación que producen las características técnicas de los presentes productos placentarios. Por consiguiente, en una realización, el producto placentario se fabrica por las etapas mostradas en la presente memoria. Los presentes productos placentarios no están limitados a productos fabricados por los métodos mostrados en la presente. Por ejemplo, los productos de la presente invención podrían producirse a través de métodos que se basan en etapas de cribado; por ejemplo, etapas para cribar preparaciones con las características técnicas descritas y propiedades superiores.

45 Los presentes productos placentarios comprenden una o más de las siguientes características técnicas:

- a. las células nativas terapéuticas viables pueden diferenciarse en células de más de un linaje (por ejemplo, linajes osteogénico, adipogénico y/o condrogénico),
- b. los factores terapéuticos naturales incluyen IGFBP1, opcionalmente presente en una cantidad sustancial,
- c. los factores terapéuticos naturales incluyen adiponectina, opcionalmente presente en una cantidad sustancial,
- 50 d. los factores terapéuticos naturales incluyen α 2-macroglobulina, opcionalmente presente en una cantidad sustancial,

ES 2 665 466 T3

- e. los factores terapéuticos naturales incluyen bFGF, opcionalmente presente en una cantidad sustancial,
- f. los factores terapéuticos naturales incluyen EGF, opcionalmente presente en una cantidad sustancial,
- 5 g. los factores terapéuticos naturales incluyen MMP-9 y TIMP1, opcionalmente presentes en una cantidad sustancial,
- h. los factores terapéuticos naturales incluyen MMP-9 y TIMP1 en una relación de aproximadamente 7 a aproximadamente 10,
- i. el producto placentario no comprende células cultivadas *ex vivo*,
- 10 j. el medio crioconservante está presente en una cantidad de más de aproximadamente 20 ml o más de aproximadamente 50 ml,
- k. el crioconservante comprende DMSO,
- l. el crioconservante comprende DMSO en una cantidad mayoritaria,
- m. el medio de crioconservación comprende además albúmina, opcionalmente en donde la albúmina es HSA,
- n. el crioconservante comprende DMSO y albúmina (por ejemplo, HSA),
- 15 o. la membrana coriónica comprende de aproximadamente 5000 a aproximadamente 240 000 células/cm² o de aproximadamente 20 000 a aproximadamente 60 000 células/cm²,
- p. la membrana coriónica comprende de 20.000 a aproximadamente 200.000 células/cm², con una viabilidad celular de al menos aproximadamente un 70 %,
- 20 q. comprende al menos: aproximadamente 7400 o aproximadamente 15.000 o aproximadamente 23.217 o aproximadamente 35.000, o aproximadamente 40.000 o aproximadamente 47.800 células estromales por cm² de la membrana coriónica,
- r. comprende de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 50.000 células estromales por cm² de la membrana coriónica,
- 25 s. comprende de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 46 % de fibroblastos no expandidos en cultivo viables por cm² del producto placentario,
- t. comprende células estromales, en donde al menos: aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 74,3 %, o aproximadamente un 83,4 o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 92,5 % de las células estromales son viables después de un ciclo de congelación-descongelación,
- 30 u. comprende células estromales, en donde de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 92,5 % de las células estromales son viables después de un ciclo de congelación-descongelación,
- v. la membrana coriónica tiene un grosor de aproximadamente 40 µm a aproximadamente 400 µm,
- w. secreta menos de aproximadamente cualquiera de: 420 pg/ml, 350 pg/ml o 280 pg/ml de TNF-α en un medio de cultivo tisular tras colocar un fragmento de 2 cm x 2 cm del producto tisular en un medio de cultivo tisular y exponer el producto tisular a un lipopolisacárido bacteriano durante aproximadamente 20 a aproximadamente 24 horas,
- 35 x. crioconservación y descongelación, secreta menos de aproximadamente cualquiera de: 420 pg/ml, 350 pg/ml o 280 pg/ml de TNF-α en un medio de cultivo tisular tras colocar un fragmento de 2 cm x 2 cm del producto tisular en un medio de cultivo tisular y exponer el producto tisular a un lipopolisacárido bacteriano durante aproximadamente 20 a aproximadamente 24 horas,
- 40 y. después de refrigeración, crioconservación y descongelación, secreta menos de aproximadamente cualquiera de: 420 pg/ml, 350 pg/ml o 280 pg/ml de TNF-α en un medio de cultivo tisular tras colocar un fragmento de 2 cm x 2 cm del producto tisular en un medio de cultivo tisular y exponer el producto tisular a un lipopolisacárido bacteriano durante aproximadamente 20 a aproximadamente 24 horas,
- 45 z. el lado materno de la membrana coriónica comprende fragmentos de proteínas de la matriz extracelular en una concentración sustancialmente mayor que la de un corion no procesado natural, opcionalmente en donde la membrana coriónica se ha tratado con dispasa II o en donde una parte sustancial de los fragmentos proteínicos comprende leucina o fenilalanina terminal,

- aa. comprende además una membrana amniótica,
- bb. comprende además una membrana amniótica, en donde la membrana amniótica comprende una capa de células epiteliales amnióticas,
- 5 cc. comprende además una membrana amniótica, en donde la membrana amniótica y la membrana coriónica están asociadas entre sí en la configuración natural,
- dd. comprende además una membrana amniótica, en donde la membrana amniótica y la membrana coriónica no están adheridas entre sí en la configuración natural,
- ee. comprende además una membrana amniótica en donde la membrana coriónica comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces más células estromales respecto a la membrana amniótica,
- 10 ff. no comprende una membrana amniótica,
- gg. la membrana coriónica comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces más células estromales respecto a una membrana amniótica del mismo área derivada de la misma placenta, y
- hh. es adecuado para aplicación dérmica a una herida.

Células

- 15 De acuerdo con la presente invención, un producto placentario comprende células terapéuticas originarias de la membrana coriónica. Las células comprenden una o más de células estromales, MSC y fibroblastos.
En una realización, las células terapéuticas originarias comprenden células estromales viables.
En una realización, las células terapéuticas originarias comprenden MSC viables.
- 20 En una realización, las células terapéuticas originarias comprenden fibroblastos viables. En una realización, las células terapéuticas originarias comprenden MSC viables y fibroblastos viables.
En una realización, las células terapéuticas originarias comprenden MSC viables y fibroblastos viables.
En una realización, las células terapéuticas originarias comprenden células estromales viables y células epiteliales viables.
- 25 En una realización, las células originarias terapéuticas son células viables que pueden diferenciarse en células de más de un linaje (por ejemplo, linajes osteogénicos, adipogénicos y/o condrogénicos).
En una realización, la membrana coriónica comprende de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 360.000 células/cm² o de aproximadamente 40.000 a aproximadamente 90.000 células/cm².
- 30 En una realización, la membrana coriónica comprende al menos: aproximadamente 7.400 o aproximadamente 15.000 o aproximadamente 23.217, o aproximadamente 35.000, o aproximadamente 40.000 o aproximadamente 47.800 de células estromales por cm² de la membrana coriónica.
En una realización, la membrana coriónica comprende de 5.000 a 50.000 células estromales por cm² de la membrana coriónica.
- 35 En una realización, la membrana coriónica comprende células estromales, en donde al menos: un 40 %, o un 50 %, o un 60 %, o un 70 %, o un 74,3 %, o un 83,4 o un 90 %, o un 92,5 % de las células estromales son viables después de un ciclo de congelación-descongelación.
En una realización, la membrana coriónica comprende células estromales en donde de un 40 % a un 92,5 % de las células estromales son viables después de un ciclo de congelación-descongelación.
- 40 En una realización, la membrana coriónica (del producto placentario) comprende fibroblastos en aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 90 % de las células totales.
- 45 En una realización, la membrana coriónica comprende macrófagos CD14+ en una cantidad de menos de aproximadamente un 5 % o menos de aproximadamente un 1 % o menos de aproximadamente un 0,5 %, opcionalmente como se demuestra por una disminución sustancial en la estimulación por LPS de la liberación de TNF α .
En una realización, el producto placentario comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces más células estromales respecto a una membrana amniótica del mismo área derivada de la misma placenta.
En una realización, el producto placentario comprende además una membrana amniótica, en donde el producto

placentario contiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces más células estromales respecto a la membrana amniótica.

En una realización, el producto placentario comprende además una membrana amniótica, en donde la membrana amniótica comprende una capa de células epiteliales amnióticas.

5 En una realización, el producto placentario está sustancialmente libre de células del trofoblasto.

En una realización, el producto placentario está sustancialmente libre de macrófagos CD14+ funcionales.

En una realización, el producto placentario está sustancialmente libre de células derivadas de tejido vascularizado.

10 En una realización, el producto placentario está sustancialmente libre de células del trofoblasto, macrófagos CD14+ funcionales y células derivadas de tejido vascularizado. Opcionalmente, el producto placentario comprende células estromales viables. Opcionalmente, el producto placentario comprende MSC viables. Opcionalmente, el producto placentario comprende MSC viables y fibroblastos viables.

En una realización, el producto placentario está sustancialmente libre de células deciduales maternas.

15 En una realización, el producto placentario está sustancialmente libre de leucocitos maternos y/o células del trofoblasto.

20 En una realización, la membrana coriónica (del producto placentario) comprende MSC en una cantidad de un 5 % a un 30 %, de un 5 % a un 25 %, de un 5 % a un 20 %, de un 5 % a un 15 %, de un 3 % a un 12 %, al menos un 5 %, al menos un 10 % o al menos un 15 %, respecto a la cantidad total de células en la membrana coriónica. Opcionalmente, al menos: un 40 %, 50 %, 60 % o 70 % de las MSC son viable después de un ciclo de congelación-descongelación.

25 En una realización, la membrana coriónica (del producto placentario) comprende fibroblastos en una cantidad de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 90 % o de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 85 %, respecto a la cantidad total de células en la membrana coriónica. Opcionalmente, al menos: aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 % o aproximadamente un 70 % de los fibroblastos son viable después de un ciclo de congelación-descongelación.

En una realización, la membrana coriónica (del producto placentario) comprende macrófagos funcionales en una cantidad de menos de aproximadamente cualquiera de: un 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0,1 %.

30 En una realización, la membrana coriónica (del producto placentario) comprende MSC y macrófagos funcionales en una relación de más de aproximadamente cualquiera de: 3:1, 4:1, 5:1, 7:1, 10:1, 12:1 o 15:1.

En una realización, la membrana coriónica comprende fibroblastos y macrófagos funcionales en una relación de más de aproximadamente cualquiera de: 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 28:1, 30:1, 35:1, 45:1 o 50:1.

En una realización, la membrana coriónica (del producto placentario) comprende fibroblastos y MSC en una relación de: aproximadamente 9:2 a aproximadamente 17:3.

35 En una realización, la membrana coriónica (del producto placentario) comprende MSC en una cantidad de al menos 1.500 células/cm², al menos 3.000 células/cm², de 15.000 a 9.000 células/cm², o de 3.000 a 9.000 células/cm². Opcionalmente, al menos: un 40 %, 50 %, 60 % o 70 % de las MSC son viable después de un ciclo de congelación-descongelación.

40 En una realización, la membrana coriónica (del producto placentario) comprende fibroblastos en una cantidad de al menos aproximadamente 7.000 células/cm², al menos aproximadamente 14.000 células/cm², de aproximadamente 7.000 a aproximadamente 51.000 células/cm², o de aproximadamente 14.000 a aproximadamente 51.000 células/cm². Opcionalmente, al menos: aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 % o aproximadamente un 70 % de los fibroblastos son viable después de un ciclo de congelación-descongelación.

45 En una realización, la membrana coriónica (del producto placentario) comprende macrófagos funcionales en una cantidad de menos de aproximadamente 3000 células/cm², o menos de aproximadamente 1.000 células/cm².

En una realización, el producto placentario está sustancialmente libre de células cultivadas *ex vivo*.

Factores placentarios

50 De acuerdo con la presente invención, un producto placentario comprende factores terapéuticos naturales de la membrana coriónica.

En una realización, los factores incluyen uno o más de: IGFBP1, adiponectina, α 2-macroglobulina, bFGF, EGF, MMP-9 y TIMP1. Opcionalmente, los factores están presentes en cantidades/cm² que son sustancialmente similares a las de una membrana coriónica natural o capa de la misma (por ejemplo, \pm 10 % o 20 %).

5 En una realización, los factores incluyen IGFBP1, adiponectina, α 2-macroglobulina, bFGF, EGF, MMP-9 y TIMP1. Opcionalmente, los factores están presentes en relaciones que son sustancialmente similares a las de una membrana coriónica natural o capa de la misma. Opcionalmente, los factores están presentes en cantidades/cm² que son sustancialmente similares a las de una membrana coriónica natural o capa de la misma (por ejemplo, \pm 10 % o 20 %).

10 En una realización, los factores incluyen MMP-9 y TIMP1 en una relación de aproximadamente 7 a aproximadamente 10 (por ejemplo, aproximadamente 7). Opcionalmente, los factores están presentes en cantidades/cm² que son sustancialmente similares a las de una membrana coriónica natural o capa de la misma (por ejemplo, \pm 10 % o 20 %).

15 En una realización, los factores incluyen uno o más (por ejemplo, una mayoría o todos) de los factores enumerados en la tabla 15. Opcionalmente, los factores están presentes en relaciones que son sustancialmente similares a las de una membrana coriónica natural o capa de la misma. Opcionalmente, los factores están presentes en cantidades/cm² que son sustancialmente similares a las de una membrana coriónica natural o capa de la misma (por ejemplo, \pm 10 % o 20 %).

En una realización, el producto placentario secreta sustancialmente menos TNF- α /cm² que una membrana coriónica no procesada natural.

20 En una realización, el producto placentario secreta sustancialmente menos TNF- α /cm² que un producto placentario natural tras la estimulación por LPS o CT.

25 En una realización, el producto placentario secreta menos de aproximadamente cualquiera de: 420 pg/ml, 350 pg/ml o 280 pg/ml de TNF- α en un medio de cultivo tisular tras colocar un fragmento de 2 cm x 2 cm del producto tisular en un medio de cultivo tisular y exponer el producto tisular a un lipopolisacárido bacteriano durante aproximadamente 20 a aproximadamente 24 horas.

En una realización, después de la crioconservación y el descongelado, el producto placentario secreta menos de aproximadamente cualquiera de: 420 pg/ml, 350 pg/ml o 280 pg/ml de TNF- α en un medio de cultivo tisular tras colocar un fragmento de 2 cm x 2 cm del producto tisular en un medio de cultivo tisular y exponer el producto tisular a un lipopolisacárido bacteriano durante aproximadamente 20 a aproximadamente 24 horas.

30 En una realización, después de la refrigeración, la crioconservación y el descongelado, el producto placentario secreta menos de aproximadamente cualquiera de: 420 pg/ml, 350 pg/ml o 280 pg/ml de TNF- α en un medio de cultivo tisular tras colocar un fragmento de 2 cm x 2 cm del producto tisular en un medio de cultivo tisular y exponer el producto tisular a un lipopolisacárido bacteriano durante aproximadamente 20 a aproximadamente 24 horas.

35 En una realización, el producto placentario comprende además un inhibidor de TNF- α añadido de forma exógena. Opcionalmente, el inhibidor de TNF- α es IL-10.

En una realización, el producto se ha tratado con un antibiótico.

Arquitectura

40 Un producto placentario de la presente invención comprende una o más capas no trofoblásticas que muestran la arquitectura de la membrana coriónica natural. Con los contenidos proporcionados en la presente memoria, los expertos en la técnica reconocerán las capas placentarias que muestran arquitectura natural, por ejemplo, capas que no se han homogeneizado o no se han tratado con colagenasa u otra enzima que altere sustancialmente la capa.

En una realización, el producto placentario comprende una capa estromal con arquitectura natural.

En una realización, el producto placentario comprende una membrana basal con arquitectura natural.

45 En una realización, el producto placentario comprende una capa reticular con arquitectura natural.

En una realización, el producto placentario comprende una capa reticular y una capa basal con arquitectura natural.

En una realización, el producto placentario comprende una capa estromal, una capa basal y una capa reticular con arquitectura natural.

50 En una realización, el producto placentario está sustancialmente libre de células del trofoblasto. En una realización, el producto placentario comprende una membrana basal con arquitectura natural y la membrana coriónica está

5 sustancialmente libre de células del trofoblasto. Opcionalmente, el lado materno del producto placentario comprende fragmentos de proteínas de la matriz extracelular en una concentración sustancialmente mayor que la de una membrana coriónica natural. Opcionalmente, el producto placentario se ha tratado con dispasa (por ejemplo, dispasa II) y/o una parte sustancial de los fragmentos proteínicos de la matriz extracelular comprende leucina o fenilalanina terminal.

En una realización, el producto placentario tiene un grosor de aproximadamente 40 µm a aproximadamente 400 µm.

10 En una realización, el producto placentario comprende además una membrana amniótica. Opcionalmente, la membrana amniótica y la membrana coriónica en el producto placentario están asociadas entre sí en la configuración natural. Como alternativa la membrana amniótica y la membrana coriónica no están adheridas entre sí en la configuración natural.

En una realización, el producto placentario no comprende una membrana amniótica.

Formulación

15 De acuerdo con la presente invención, el producto placentario puede formularse con un medio de criopreservación.

En una realización, el medio de criopreservación comprende uno o más criopreservantes de penetración celular, uno o más criopreservantes sin penetración celular, o una combinación de los mismos.

Opcionalmente, el medio de criopreservación comprende uno o más criopreservantes de penetración celular seleccionados de DMSO, un glicerol, un glicol, un propilenglicol, un etilenglicol o una combinación de los mismos.

20 Opcionalmente, el medio de criopreservación comprende uno o más criopreservantes sin penetración celular seleccionados de polivinilpirrolidona, un hidroxietil almidón, un polisacárido, un monosacárido, un alcohol de azúcar, un alginato, una trehalosa, una rafinosa, un dextrano o una combinación de los mismos.

Otros ejemplos de criopreservantes útiles se describen en "Cryopreservation" (BioFiles volumen 5 número 4 hoja de datos de Sigma-Aldrich®).

25 En una realización, el medio de criopreservación comprende un criopreservante de penetración celular, en donde la mayor parte del criopreservante de penetración celular es DMSO. Opcionalmente, el medio de criopreservación no comprende una cantidad sustancial de glicerol.

30 En una realización, el medio de criopreservación comprende DMSO. Opcionalmente, el medio de criopreservación no comprende glicerol en una cantidad mayoritaria. Opcionalmente, el medio de criopreservación no comprende una cantidad sustancial de glicerol.

En una realización, el medio de criopreservación comprende componentes adicionales tales como albúmina (por ejemplo, HSA o BSA), una solución de electrolitos (por ejemplo, Plasma-Lyte) o una combinación de las mismas.

35 En una realización, el medio de criopreservación comprende de un 1 % a aproximadamente un 15 % de albúmina en peso y de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % de criopreservante en volumen (por ejemplo, aproximadamente un 10 %). Opcionalmente, el criopreservante comprende DMSO (por ejemplo, en una cantidad mayoritaria).

40 En una realización, el producto placentario se formula en más de aproximadamente 20 ml o más de aproximadamente 50 ml de medio de criopreservación. Opcionalmente, el criopreservante comprende DMSO (por ejemplo, en una cantidad mayoritaria). Opcionalmente, el medio de criopreservación no comprende una cantidad sustancial de glicerol.

En una realización, el producto placentario se coloca en papel de nitrocelulosa.

En una realización, la placenta se corta en una pluralidad de secciones. Opcionalmente, las secciones son de menos de aproximadamente 10 cm x 10 cm. Opcionalmente, las secciones son entre aproximadamente 2 cm x 2 cm y 5 cm x 5 cm.

45 **Fabricación**

Visión de conjunto

Un producto placentario de la presente invención puede fabricarse a partir de una placenta de cualquier manera adecuada que proporcione las características técnicas mostradas en la presente memoria. De acuerdo con la presente invención, un producto placentario comprende al menos una membrana coriónica inmunocompatible.

50 En una realización, un producto placentario se fabrica por un método que comprende:

- a. obtener una placenta,
- b. reducir de forma selectiva la inmunogenicidad de la placenta; y
- c. crioconservar la placenta.

En una realización, un producto placentario se fabrica por un método que comprende:

- 5 a. obtener una placenta;
- b. eliminar una parte sustancial de las células del trofoblasto de la placenta; y
- c. crioconservar la placenta.

Opcionalmente, el método comprende una etapa de eliminación de la membrana amniótica o parte de la misma ("una membrana amniótica") de la placenta. Opcionalmente, el método comprende una etapa de eliminación de una membrana amniótica de la placenta sin eliminar una parte sustancial de las células epiteliales amnióticas de la placenta.

Opcionalmente, la etapa de eliminación de una parte sustancial de células del trofoblasto de la placenta comprende tratar la placenta con una enzima digestiva tal como una proteasa (por ejemplo, dispasa o dispasa II), eliminar mecánicamente las células del trofoblasto de la placenta (por ejemplo, por raspado) o una combinación de las mismas.

Opcionalmente, el método comprende una etapa de eliminación del tejido vascularizado de la placenta, por ejemplo, lisando los glóbulos rojos, eliminando los coágulos sanguíneos o una combinación de las mismas.

Opcionalmente, el método comprende una etapa de tratamiento de la placenta con uno o más antibióticos.

Opcionalmente, el método comprende la etapa de reducción selectiva de los macrófagos CD14+.

20 Opcionalmente, la etapa de crioconservación de la placenta comprende congelar la placenta en un medio de crioconservación que comprende uno o más crioconservantes de penetración celular, uno o más crioconservantes sin penetración celular o una combinación de los mismos.

Opcionalmente, la etapa de crioconservación de la placenta comprende refrigeración durante un periodo de tiempo y después congelación, reduciendo de ese modo de forma selectiva los macrófagos CD14+.

25 Un producto placentario ejemplar de la presente invención puede fabricarse o proporcionarse con un apósito o sustituto de la piel.

Inmunocompatibilidad y reducción selectiva

30 En una realización, el producto placentario de la invención es inmunocompatible. La inmunocompatibilidad puede conseguirse por cualquier etapa de reducción selectiva que elimine las células o factores inmunógenos o la inmunogenicidad de la placenta (o membrana coriónica de la misma).

35 En una realización, el producto placentario se hace inmunocompatible reduciendo de forma selectiva sus células inmunógenas funcionales. Una placenta puede hacerse inmunocompatible eliminando de forma selectiva las células inmunógenas de la placenta (o membrana coriónica de la misma) respecto a las células terapéuticas. Por ejemplo, las células inmunógenas puede retirarse eliminando las células inmunógenas o por purificación de la placenta de las mismas.

En una realización, la placenta se hace inmunocompatible reduciendo de forma selectiva las células del trofoblasto, por ejemplo, retirando la capa del trofoblasto.

40 En una realización, la placenta se hace inmunocompatible por reducción selectiva de los macrófagos CD14+ funcionales, opcionalmente provocando la reducción de TNF α tras la estimulación, o una combinación de las mismas.

En una realización, la placenta se hace inmunocompatible por reducción selectiva de las células derivadas de tejido vascularizado.

En una realización, la placenta se hace inmunocompatible por reducción selectiva de los macrófagos CD14+ funcionales, las células del trofoblasto y células derivadas de tejido vascularizado.

45 En una realización, el producto placentario se hace inmunocompatible por reducción selectiva de las células del trofoblasto y/o los macrófagos CD14+, opcionalmente provocando la reducción de TNF α tras la estimulación.

Eliminación del trofoblasto

En una realización, las células del trofoblasto se reducen o retiran del producto placentario. Sorprendentemente, dicho producto placentario tiene una o más de las siguientes características superiores:

- a. es sustancialmente no inmunógeno;
- 5 b. proporciona un tiempo de cicatrización destacable; y
- c. proporciona eficacia terapéutica potenciada.

Las células del trofoblasto pueden retirarse de cualquier manera adecuada que disminuya sustancialmente el contenido del trofoblasto del producto placentario. Opcionalmente, las células del trofoblasto 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 (por ejemplo, MSC, factores placentarios, etc.). Opcionalmente, se retira una mayoría (por ejemplo, sustancialmente todo) de las células del trofoblasto.

Un método de eliminación de las células del trofoblasto comprende tratar la placenta (por ejemplo, corion o amniocorion) con una enzima digestiva tal como dispasa (por ejemplo, dispasa II) y separar las células del trofoblasto de la placenta. Opcionalmente, la etapa de separación comprende la separación mecánica tal como abrasión o raspado. Opcionalmente, el raspado comprende el raspado con un instrumento suave tal como un dedo.

Un método de eliminación de las células del trofoblasto comprende tratar la membrana coriónica con dispasa durante aproximadamente 30 a aproximadamente 45 minutos, lo que separa las células del trofoblasto de la placenta. Opcionalmente, la dispasa se proporciona en una solución de aproximadamente menos de aproximadamente un 1 % (por ejemplo, aproximadamente un 0,5 %). Opcionalmente, la etapa de separación comprende la separación mecánica tal como abrasión o raspado. Opcionalmente, el raspado comprende el raspado con un instrumento suave tal como un dedo.

Los métodos útiles de eliminación de células del trofoblasto de una placenta (por ejemplo, corion) se describen por 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").

En una realización, las células del trofoblasto se retiran antes de la crioconservación.

30 Eliminación de macrófagos

En una realización, los macrófagos funcionales se reducen o retiran del producto placentario. Sorprendentemente, dicho producto placentario tiene una o más de las siguientes características superiores:

- a. es sustancialmente no inmunógeno;
- b. proporciona un tiempo de cicatrización destacable; y
- 35 c. proporciona eficacia terapéutica potenciada.

Los macrófagos funcionales pueden retirarse de cualquier manera adecuada que disminuya sustancialmente el contenido de macrófagos del producto placentario. Opcionalmente, los macrófagos 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 (por ejemplo, MSC, factores placentarios, etc.). Opcionalmente, se retira una mayoría (por ejemplo, sustancialmente todo) de los macrófagos.

Un método de retirada de las células inmunitarias tales como los macrófagos comprende eliminar las células inmunitarias por tasas rápidas de congelación, tales como 60-100 °C/min.

Aunque las células inmunitarias pueden eliminarse por tasas rápidas de congelación, dicho método puede ser también perjudicial para las células terapéuticas, tales como las células estromales (por ejemplo, MSC). Los autores de la presente invención han descubierto un método de eliminación selectiva de los macrófagos CD14+, que pueden eliminarse de forma selectiva refrigerando la placenta durante un periodo de tiempo (por ejemplo, durante al menos aproximadamente 10 min tal como durante aproximadamente 30-60 min) a una temperatura por encima de la congelación (por ejemplo, incubando a 2-8 °C) y después congelando la placenta (por ejemplo, incubando a -80 °C ± 5 °C). Opcionalmente, la etapa de congelación comprende congelar a una tasa de menos de 10 °/min (por ejemplo, menos de aproximadamente 5 °/min tal como a aproximadamente 1 °/min).

En una realización, la etapa de refrigeración comprende impregnar la placenta en un medio de crioconservación

5 (por ejemplo, que contiene DMSO) durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el medio de crioconservación penetre en (por ejemplo, se equilibre con) los tejidos placentarios. Opcionalmente, la etapa de congelación comprende reducir la temperatura a una tasa de aproximadamente 1 °/min. Opcionalmente, la etapa de congelación comprende congelar a una tasa de menos de 10 °/min (por ejemplo, menos de aproximadamente 5 °/min tal como a aproximadamente 1 °/min).

10 En una realización, la etapa de refrigeración comprende impregnar la placenta en un medio de crioconservación (por ejemplo, que contiene DMSO) a una temperatura de aproximadamente -10-15 °C (por ejemplo, a 2-8 °C) durante al menos aproximadamente cualquiera de: 10 min, 20 min, 30 min, 40 min o 50 min. En otra realización, la etapa de refrigeración comprende impregnar la placenta en un medio de crioconservación (por ejemplo, que contiene DMSO) a una temperatura de aproximadamente -10-15 °C (por ejemplo, a 2-8 °C) durante aproximadamente cualquiera de: 10-120, 20-90 min o 30-60 min. Opcionalmente, la etapa de congelación comprende congelar a una tasa de menos de 10 °/min (por ejemplo, menos de aproximadamente 5 °/min tal como a aproximadamente 1 °/min).

Eliminación de células derivadas de tejido vascularizado

15 En una realización, las células derivadas de tejido vascularizado (o tejido vascular) se reducen o retiran del producto placentario. Sorprendentemente, dicho producto placentario tiene una o más de las siguientes características superiores:

- a. es sustancialmente no inmunógeno;
- b. proporciona un tiempo de cicatrización destacable; y
- 20 c. proporciona eficacia terapéutica potenciada.

Las células derivadas de tejido vascularizado pueden retirarse de cualquier manera adecuada que disminuya sustancialmente el contenido de dichas células del producto placentario. Opcionalmente, las células derivadas de tejido vascularizado 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 (por ejemplo, MSC, factores placentarios, etc.).

25 En una realización, la eliminación de células derivadas de tejido vascularizado comprende separar el corion de la placenta cortando alrededor del reborde placentario en el lado opuesto del cordón umbilical. El corion en el lado umbilical de la placenta no se elimina debido a la vascularización en este lado.

30 En una realización, la eliminación de células derivadas de tejido vascularizado comprende lavar la membrana coriónica (por ejemplo, con tampón tal como PBS) para retirar los coágulos sanguíneos gruesos y cualquier exceso de glóbulos.

En una realización, la eliminación de células derivadas de tejido vascularizado comprende tratar la membrana coriónica con un anticoagulante (por ejemplo, solución de dextrosa y citrato).

35 En una realización, la eliminación de células derivadas de tejido vascularizado comprende separar el corion de la placenta cortando alrededor del reborde placentario en el lado opuesto del cordón umbilical y lavar la membrana coriónica (por ejemplo, con tampón tal como PBS) para retirar los coágulos sanguíneos de tamaño importante y cualquier exceso de glóbulos.

En una realización, la eliminación de células derivadas de tejido vascularizado comprende separar el corion de la placenta cortando alrededor del reborde placentario en el lado opuesto del cordón umbilical y tratar la membrana coriónica con un anticoagulante (por ejemplo, solución de dextrosa y citrato).

40 En una realización, la eliminación de células derivadas de tejido vascularizado comprende separar el corion de la placenta cortando alrededor del reborde placentario en el lado opuesto del cordón umbilical, lavar la membrana coriónica (por ejemplo, con tampón tal como PBS) para retirar los coágulos sanguíneos de tamaño importante y cualquier exceso de glóbulos, y tratar la membrana coriónica con un anticoagulante (por ejemplo, solución de dextrosa y citrato).

45 Reducción selectiva de la inmunogenicidad, demostrada por una disminución sustancial en la estimulación por LPS de la liberación de TNF α .

En una realización, se reduce de forma selectiva la inmunogenicidad del producto placentario, demostrada por una reducción en la liberación de TNF- α estimulada por LPS, una reducción de TNF- α reducido o eliminado del producto placentario.

50 En una realización, se reduce TNF- α eliminando o retirando los macrófagos.

En una realización, se reduce TNF- α por tratamiento con un anticuerpo anti-TNF- α .

En una realización, se reduce de forma funcional TNF- α por tratamiento con IL-10, que suprime la secreción de TNF- α .

Conservación

5 Un producto placentario de la presente invención puede usarse fresco o puede conservarse durante un periodo de tiempo. Sorprendentemente, la crioconservación produce productos placentarios inmunocompatibles.

En una realización, un producto placentario está crioconservado. Un producto placentario puede crioconservarse por incubación a temperaturas de congelación (por ejemplo, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) en un medio crioconservante.

10 La crioconservación puede comprender, por ejemplo, incubar el producto placentario a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30-60 min, y después incubar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El producto placentario después puede descongelarse para su uso. Opcionalmente, el producto placentario se crioconserva de una manera tal que se retiene la viabilidad celular sorprendentemente bien después de un ciclo de congelación-descongelación.

15 En una realización, la crioconservación comprende almacenamiento en un medio de crioconservación que comprende uno o más crioconservantes de penetración celular, uno o más crioconservantes sin penetración celular, o una combinación de los mismos. Opcionalmente, el medio de crioconservación comprende uno o más crioconservantes de penetración celular seleccionados de DMSO, un glicerol, un glicol, un propilenglicol, un etilenglicol o una combinación de los mismos. Opcionalmente, el medio de crioconservación comprende uno o más crioconservantes sin penetración celular seleccionados de polivinilpirrolidona, un hidroxietil almidón, un polisacárido, un monosacárido, un alcohol de azúcar, un alginato, una trehalosa, una rafinosa, un dextrano o una combinación de los mismos. Otros ejemplos de crioconservantes útiles se describen en "Cryopreservation" (BioFiles volumen 5 número 4 hoja de datos de Sigma-Aldrich®).

20 En una realización, el medio de crioconservación comprende un crioconservante de penetración celular, en donde la mayor parte del crioconservante de penetración celular es DMSO. Opcionalmente, el medio de crioconservación no comprende una cantidad sustancial de glicerol.

25 En una realización, el medio de crioconservación comprende DMSO. Opcionalmente, el medio de crioconservación no comprende glicerol en una cantidad mayoritaria. Opcionalmente, el medio de crioconservación no comprende una cantidad sustancial de glicerol.

En una realización, el medio de crioconservación comprende componentes adicionales tales como albúmina (por ejemplo, HSA o BSA), una solución de electrolitos (por ejemplo, Plasma-Lyte) o una combinación de las mismas.

30 En una realización, el medio de crioconservación comprende de un 1 % a aproximadamente un 15 % de albúmina en peso y de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % de crioconservante en volumen (por ejemplo, aproximadamente un 10 %). Opcionalmente, el crioconservante comprende DMSO (por ejemplo, en una cantidad mayoritaria).

En una realización, la crioconservación comprende colocar la placenta en papel de nitrocelulosa.

35 En una realización, la placenta se corta en una pluralidad de secciones antes de la crioconservación. Opcionalmente, las secciones se colocan en papel de nitrocelulosa antes de la refrigeración.

Métodos de uso

Los productos placentarios (por ejemplo, derivado de tejido coriónico) de la presente invención pueden usarse para tratar cualquier lesión tisular. Puede proporcionarse un método de tratamiento, por ejemplo, por la administración a un sujeto que lo necesita, de un producto placentario de la presente invención.

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

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

45 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 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.

50 En una realización, un presente producto placentario se administra a un sujeto para tratar una quemadura. Opcionalmente, la quemadura es una quemadura de primera grado, quemadura de segundo grado (quemaduras de espesor parcial), quemaduras de tercer grado (quemaduras de espesor total), infección de una herida por

quemadura, infección de una herida extirpada y no extirpada, pérdida de epitelio de una quemadura con un injerto previo o curada, o impétigo de herida por quemadura.

En una realización, un presente producto placentario se administra a un sujeto para tratar una úlcera, por ejemplo, una úlcera diabética (por ejemplo, úlcera en el pie).

- 5 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 lado 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.

- 10 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 llamada cirugía estética (por ejemplo, rinoplastia, ritidectomía, etc.).

- 15 En una realización, un producto placentario se administra a la epidermis para acelerar la cicatrización asociada con un procedimiento de ablación dérmica o un procedimiento de abrasión dérmica (por ejemplo, incluyendo ablación con láser, ablación térmica, ablación eléctrica, ablación dérmica profunda, ablación subdérmica, ablación fraccionada y abrasión microdérmica).

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

- 20 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 (por ejemplo, para promover la cicatrización y/o la adhesión al sustrato). A modo de ejemplo no limitante, los tejidos tales como la piel, el cartílago, el ligamento, el tendón, el periostio, el pericondrio, la cápsula sinovial, la fascia, mesenterio y tendones pueden usarse como injerto tisular.

- 25 En una realización, un producto placentario se usa en una cirugía de tendón o ligamento para promover la cicatrización 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, por ejemplo, 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 del tendón o ligamento a un hueso.

- 35 A través de las percepciones de los autores de la presente invención, se ha descubierto sorprendentemente que los productos placentarios de la presente invención proporcionan un tratamiento superior (por ejemplo, tiempo de cicatrización y/o resistencia tras la cicatrización) 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 autores de la presente invención creen que el potencial osteogénico y/o condrogénico de las MSC en los presentes productos placentarios promueve el proceso de cicatrización y la resistencia tras la cicatrización de tendones o ligamentos. Los autores de la presente invención creen que los presentes productos placentarios proporcionan un tratamiento alternativo o auxiliar para tratamientos basados 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 marzo; 19(3):290-6), Chen et al. ("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), cada uno de los cuales se incorpora por para referencia.

- 45 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 de hueso 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.

- 50 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 extensor y un tendón del manquito de los rotadores.

- 55 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 (por ejemplo, fibrosis posoperatoria).

5 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, laminectomía, rodilla, hombro o heridas o lesiones relacionados con traumatismos al nacer, procedimientos cardiovasculares, estimulación de angiogénesis, procedimientos cerebrales/neurológicos, cuidado de quemaduras y heridas, y procedimientos oftálmicos. Por ejemplo, opcionalmente, la herida está asociada con lesión de la columna y el lado
10 estromal del producto placentario se aplica a la duramadre (por ejemplo, el lado estromal aplicado sobre la duramadre). Las indicaciones para dichos procedimientos, incluyendo la selección de sitios de herida y/o metodologías, pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos WO 2009/132186 y US 2010/0098743, que se incorporan por la presente por referencia.

15 Un producto placentario de la presente invención puede usarse opcionalmente para reducir la adhesión o fibrosis de una herida. La fibrosis posoperatoria es una consecuencia natural de la cicatrización de todas las heridas quirúrgicas. Por ejemplo, la adhesión peridural posoperatoria provoca inmovilización, tracción y compresión de la duramadre y las raíces nerviosas, que causa una reaparición 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
20 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.

25 Sin limitarse a teoría alguna, los autores de la presente invención creen que los productos placentarios mostrados en la presente memoria son útiles para reducir la adhesión o la fibrosis de una herida, al menos en parte, porque los productos placentarios pueden realizar la función muy crítica en el sitio de proporcionar un entorno inmunoprivilegiado (es decir, resistencia relativamente elevada contra las respuestas inmunitarias) en el proceso de desarrollo humano. Una ventaja de los cuidados y procesos de heridas de la presente invención es que se
30 proporciona una barrera antiadhesión que puede usarse para prevenir las adhesiones después de cirugía y, en particular, después de cirugía lumbar.

En los párrafos precedentes, el uso del singular puede incluir el plural excepto cuando se indique específicamente. Como se emplea en esta memoria, las palabras "uno", "una" y "el", "la" significan "uno o más", salvo que se indique lo contrario. Además, cuando se describen aspectos de la presente tecnología con referencia a listas de
35 alternativas, la tecnología incluye cualquier miembro individual o subgrupo de la lista de alternativas y cualquier combinación de uno o más de los mismos.

Debe apreciarse que el alcance de la presente tecnología no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas anteriormente. La presente tecnología puede ponerse en práctica de manera diferente a la descrita particularmente y aún estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

40 Asimismo, los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente la presente tecnología. No deben interpretarse de ninguna manera, sin embargo, como limitantes del amplio alcance de la tecnología descrita en la presente memoria.

Ejemplos

45 Otras características y realizaciones de la presente tecnología llegarán a ser evidentes a partir de los siguientes ejemplos que se proporcionan para la ilustración de la presente tecnología, en lugar de para limitar su alcance pretendido.

Ejemplo 1 Caracterización de membranas placentarias

50 La caracterización de células en membranas placentarias por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) demostró la presencia de células estromales (células de tipo células madre mesenquimatosas) además de células epiteliales fetales y fibroblastos en membrana amniótica y/o coriónica.

Una característica única de los productos placentarios descritos en la presente es la presencia de MSC, que se ha demostrado que son uno de los tres tipos de células (además de las células epiteliales y los fibroblastos) que son importantes para la cicatrización de heridas. Las membranas placentarias secretan una diversidad de factores implicados en la cicatrización de heridas, tales como factores angiogénicos, factores que mantienen la proliferación
55 y la migración de células epiteliales y fibroblastos, factores que atraen las células madre endoteliales desde la circulación sanguínea al sitio de herida, factores antibacterianos y otros.

La evaluación de las proteínas secretadas por productos placentarios ejemplares de la invención en comparación con Apligraf y Dermagraft demostró varios factores de crecimiento presentes en los productos ensayados que están implicados en la cicatrización de heridas. Los ejemplos son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante (TGF) y otros. Sin embargo, varios factores únicos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que es uno de los factores clave para la cicatrización de heridas, están presentes en membranas placentarias y ausentes en Apligraf y Dermagraft. Además, las membranas placentarias tienen una relación favorable de proteasa a inhibidor de proteasa para la cicatrización de heridas. En un modelo *in vitro* de cicatrización de heridas (ensayo de migración celular, descrito en la presente memoria), los autores de la presente invención han demostrado que las membranas placentarias secretan factores que promueven la migración celular que mantienen el cierre de la herida.

Ejemplo 2 Proceso de fabricación ejemplar de un producto placentario

En una realización, la presente solicitud describe un procedimiento para fabricar membranas coriónicas a partir de placenta posparto.

15 Ejemplo 2.1 Proceso de fabricación ejemplar de producto de membrana coriónica

Un método de fabricación de un producto placentario que comprende una membrana coriónica de acuerdo con el procedimiento de fabricación descrito en la presente es el siguiente:

- a. Se retira el cordón umbilical cerca de la superficie placentaria,
- b. Se disecciona de forma roma del amnios en el reborde placentario,
- 20 c. Se da la vuelta a la placenta y se retira completamente el amnios,
- d. Se retira el corion cortando alrededor del reborde placentario,
- e. Se lava la membrana coriónica en PBS para retirar los glóbulos rojos,
- f. Se lava la membrana coriónica una vez con solución de ACD-A al 11 % para ayudar a retirar los glóbulos rojos,
- 25 g. Se lava la membrana coriónica con PBS para retirar la solución de ACD-A,
- h. Se trata el corion en solución al 0,5 % de dispasa a 37 °C ± 2 °C durante 30-45 minutos, opcionalmente, durante el periodo de incubación con dispasa, se usa PBS para retirar cualquier cantidad de sangre restante del amnios,
- 30 i. Cuando se ha completado el tratamiento con dispasa, se lava el corion con PBS para retirar la solución de dispasa,
- j. Se retira suavemente la capa del trofoblasto del corion, por ejemplo, por raspado (por ejemplo, con el dedo),
- k. Se coloca el corion en un frasco que contiene solución antibiótica y se incuba a 37 °C ± 2 °C durante 24-28 h,
- l. Se retira el frasco de la incubadora y se lava cada membrana con PBS para retirar la solución antibiótica,
- m. Se monta el corion en papel de nitrocelulosa reforzado y se corta al tamaño necesario,
- 35 n. Se coloca cada fragmento en una criobolsa FP-90 y se sella por calor,
- o. Se añaden 50 ml de solución de crioconservación a la bolsa mediante una jeringa y se retira cualquier cantidad de aire atrapado dentro de la bolsa con la jeringa,
- p. Se sella el tubo de la línea de solución en la bolsa FP-90,
- q. Se coloca la bolsa llena en una segunda bolsa y se sella por calor,
- 40 r. Se coloca la unidad en un cartón de embalaje,
- s. Se refrigera a 2-8 °C durante 30-60 minutos, Se congela a -80 °C ± 5 °C dentro de un recipiente de Styrofoam.

Ejemplo 2.2 Proceso de fabricación ejemplar de producto que comprende membrana coriónica y membrana amniótica

45 Un método de fabricación de un producto placentario que comprende una membrana coriónica y una membrana

amniótica de acuerdo con el procedimiento de fabricación descrito en la presente es el siguiente:

- a. Se retira el cordón umbilical cerca de la superficie placentaria,
- b. Se disecciona de forma roma del amnios en el reborde placentario,
- c. Se da la vuelta a la placenta y se retira completamente el amnios,
- 5 d. Se retira el corion cortando alrededor del reborde placentario,
- e. Se lavan ambas membranas en PBS para retirar los glóbulos rojos,
- f. Se lavan ambas membranas una vez con solución de ACD-A al 11 % para ayudar a retirar los glóbulos rojos,
- g. Se lavan ambas membranas con PBS para retirar la solución de ACD-A,
- 10 h. Se trata el corion en solución al 0,5 % de dispasa a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 30-45 minutos, opcionalmente, durante el periodo de incubación con dispasa, se usa PBS para retirar cualquier cantidad de sangre restante del amnios,
- i. Se retira suavemente la capa de tejido conjuntivo del amnios,
- j. Se coloca el amnios en PBS y se deja aparte,
- 15 k. Cuando se ha completado el tratamiento con dispasa, se lava el corion con PBS para retirar la solución de dispasa,
- l. Se retira suavemente la capa del trofoblasto del corion,
- m. Se coloca el amnios y el corion cada uno en un frasco que contiene solución antibiótica y se incuba a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 24-28 h,
- 20 n. Se retiran los frascos de la incubadora y se aclara cada membrana con PBS para retirar la solución antibiótica,
- o. Se monta el amnios (el lado epitelial para arriba) o el corion sobre papel de nitrocelulosa reforzado y se corta al tamaño necesario,
- p. Se coloca cada fragmento en una criobolsa FP-90 y se sella por calor,
- 25 q. Se añaden 50 ml de solución de crioconservación a la bolsa mediante una jeringa y se retira cualquier cantidad de aire atrapado dentro de la bolsa con la jeringa,
- r. Se sella el tubo de la línea de solución en la bolsa FP-90,
- s. Se coloca la bolsa llena en una segunda bolsa y se sella por calor,
- t. Se coloca la unidad en un cartón de embalaje,
- 30 u. Se refrigera a $2-8\text{ °C}$ durante 30-60 minutos, Se congela a $-80\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ dentro de un recipiente de Styrofoam.

Ejemplo 2.3 Proceso de fabricación el producto placentario ejemplar

Un método de fabricación de un producto placentario que comprende una membrana coriónica de acuerdo con el procedimiento de fabricación descrito en la presente fue el siguiente:

- 35 La placenta se procesó dentro de una cabina de seguridad biológica. Primero se retiró el cordón umbilical, y la membrana amniótica se desprendió de la membrana coriónica subyacente usando disección roma. Posteriormente, el corion se retiró cortando alrededor del reborde placentario en el lado opuesto del cordón umbilical. El corion en el lado umbilical de la placenta no se eliminó debido a la vascularización en este lado. La membrana coriónica se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY)
- 40 para retirar los coágulos sanguíneos groseros y cualquier exceso de glóbulos. La membrana entonces se lavó con solución anticoagulante de dextrosa y citrato (USP) al 11 % fórmula A (ACD-A) (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) en solución salina (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) para retirar los glóbulos restantes.

- 45 El corion se incubó a continuación en 200 ml de una solución de dispasa al 0,5 % (BD Biosciences, Bedford, MA) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Lonza, Walkersville, MD) a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 30-45 minutos para digerir la capa de tejido conjuntivo entre el corion y la capa del trofoblasto adyacente. Una vez

completado el periodo de incubación del corion, el corion se lavó con PBS para retirar la solución de dispasa. Posteriormente, la capa del trofoblasto se retiró por abrasión suave o raspado de estas células deciduales maternas.

5 A continuación, el corion se desinfectó en 500 ml de solución antibiótica que consiste en sulfato de gentamicina (50 µg/ml) (Abraxis Pharmaceutical Products, Schaumburg, IL), vancomicina HCl (50 µg/ml) (Hospira Inc. Lake Forest, IL) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en DMEM a 37 °C ± 2 °C durante 24-28 horas.

Se usaron tapones ventilados con los matraces de incubación. Después del periodo de incubación, la membrana se lavó con PBS para retirar cualquier cantidad de solución antibiótica residual.

10 La membrana se montó en papel de nitrocelulosa reforzado Optitran BA-S 85 (Whatman, Dassel, Alemania) y se cortó al tamaño apropiado para envasarla en una criobolsa FP-90 (Charter Medical Ltd., Winston-Salem, NC). Una vez la unidad de membrana se puso en la criobolsa FP-90 y la criobolsa se selló por calor, se añadieron 50 ml de una solución de crioconservación que contenía dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % (Bioniche Teo. Inverin Co., Galway, Irlanda) y seroalbúmina humana (HSA) al 5 % (Baxter, West Lake Village, CA) en PlasmaLyte-A (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) a través de la línea de tubos central. Se retiró cualquier exceso de aire, y la línea de tubos se selló posteriormente.

15 La criobolsa FP-90 se puso en una bolsa Mangar (25,4 cm x 15,24 cm (10 pulg. x 6 pulg.)). (Mangar Industries, New Britain, PA), que después se selló por calor. La bolsa Mangar se puso en un cartón de embalaje (26,67 cm x 16,51 x 1,52 cm (10,5 pulg. x 6,5 pulg. x 0,6 pulg.)) (Diamond Packaging, Rochester, NY). Todos los cartones se refrigeraron a 2-8 °C durante 30-60 minutos antes de la congelación a -80 °C ± 5 °C dentro de un recipiente de Styrofoam.

Ejemplo 2.4 Proceso de fabricación ejemplar de un producto placentario que comprende membrana coriónica y membrana amniótica

25 Un método de fabricación de un producto placentario que comprende un producto de membrana coriónica y un producto de membrana amniótica de acuerdo con el procedimiento de fabricación descrito en la presente fue el siguiente:

30 La placenta se procesó dentro de una cabina de seguridad biológica. Primero se retiró el cordón umbilical, y la membrana amniótica se desprendió de la membrana coriónica subyacente usando disección roma. Posteriormente, el corion se retiró cortando alrededor del reborde placentario en el lado opuesto del cordón umbilical. El corion en el lado umbilical de la placenta no se eliminó debido a la vascularización en este lado. Ambas membranas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY) para retirar los coágulos sanguíneos groseros y cualquier exceso de glóbulos. Las membranas entonces se lavaron con solución anticoagulante de dextrosa y citrato (USP) al 11 % fórmula A (ACD-A) (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) en solución salina (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) para retirar los glóbulos restantes.

35 El corion se incubó a continuación en 200 ml de una solución de dispasa al 0,5 % (BD Biosciences, Bedford, MA) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Lonza, Walkersville, MD) a 37 °C ± 2 °C durante 30-45 minutos para digerir la capa de tejido conjuntivo entre el corion y la capa del trofoblasto adyacente. Durante este periodo de incubación, el lado estromal del amnios se limpió por raspado suave de cualquier cantidad de tejido conjuntivo restante. Una vez completado el periodo de incubación del corion, el corion se lavó con PBS para retirar la solución de dispasa. Posteriormente, la capa del trofoblasto se retiró por abrasión suave o raspado de estas células deciduales maternas.

40 A continuación, el amnios y el corion se desinfectaron cada uno en 500 ml de solución antibiótica que consiste en sulfato de gentamicina (50 µg/ml) (Abraxis Pharmaceutical Products, Schaumburg, IL), vancomicina HCl (50 µg/ml) (Hospira Inc. Lake Forest, IL) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en DMEM a 37 °C ± 2 °C durante 24-28 horas. Se usaron tapones ventilados con los matraces de incubación. Después del periodo de incubación, las membranas se lavaron con PBS para retirar cualquier cantidad de solución antibiótica residual.

45 Las membranas se montaron en papel de nitrocelulosa reforzado Optitran BA-S 85 (Whatman, Dassel, Alemania) y se cortó al tamaño apropiado para envasarla en una criobolsa FP-90 (Charter Medical Ltd., Winston-Salem, NC). Para el amnios, el lado estromal se montó hacia el papel de nitrocelulosa. Una vez una unidad de membrana se puso en la criobolsa FP-90 y la criobolsa se selló por calor, se añadieron 50 ml de una solución de crioconservación que contenía dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % (Bioniche Teo. Inverin Co., Galway, Irlanda) y seroalbúmina humana (HSA) al 5 % (Baxter, West Lake Village, CA) en PlasmaLyte-A (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) a través de la línea de tubos central. Se retiró cualquier exceso de aire, y la línea de tubos se selló posteriormente.

55 La criobolsa FP-90 se puso en una bolsa Mangar (25,4 cm x 15,24 cm (10 pulg. x 6 pulg.)). (Mangar Industries, New Britain, PA), que después se selló por calor. La bolsa Mangar se puso en un cartón de embalaje (26,67 cm x 16,51 x 1,52 cm (10,5 pulg. x 6,5 pulg. x 0,6 pulg.)) (Diamond Packaging, Rochester, NY). Todos los cartones se refrigeraron a 2-8 °C durante 30-60 minutos antes de la congelación a -80 °C ± 5 °C dentro de un recipiente de

Styrofoam.

Ejemplo 3 Evaluación cuantitativa de la cantidad de células y la viabilidad celular después de digestión enzimática de membranas placentarias

5 Las membranas amniótica y coriónica y los presentes productos placentarios (de anteriormente) se evaluaron para la cantidad de células y la viabilidad celular durante todo el proceso. Estos análisis se realizaron sobre tejido placentario fresco (antes de la etapa de tratamiento con antibiótico), tejido placentario después del tratamiento con antibiótico y unidades de producto después de la descongelación. Las células se aislaron de las membranas placentarias usando digestión enzimática. Para las unidades de producto congeladas, primero se retiraron las criobolsas FP-90 de los cartones de embalaje y las bolsas Mangar. A continuación, las criobolsas FP-90 se descongelaron durante 2-3 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente. Los primeros experimentos implicaron el uso de un baño de agua a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Después de descongelarlas, las membranas placentarias se retiraron de la criobolsa FP-90 y se colocaron en un depósito que contenía solución salina (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) durante un mínimo de 1 minuto y un máximo de 60 minutos. Cada membrana se desprendió del papel de nitrocelulosa reforzado antes de la digestión.

15 Las membranas amnióticas se digirieron con 40 ml de solución de colagenasa al 0,75 % (Worthington Biochemical Corp. Lakewood, NJ) a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 20-40 minutos en un balanceador. Después de la digestión con colagenasa, las muestras se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró, y se añadieron 40 ml de tripsina al 0,05 %-EDTA (Lonza, Walkersville, MD) y se incubaron a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 5-15 minutos adicionales en un balanceador. La tripsina se calentó hasta $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ en un baño de agua antes de su uso. Después de la digestión con tripsina, la suspensión se filtró a través de un filtro de nailon de tamiz celular de 100 μm para retirar cualquier desecho. Se realizó centrifugación a 2.000 rpm durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante. Los sedimentos celulares se reconstituyeron con un volumen de PlasmaLyte-A que fue proporcional al tamaño del sedimento, y se mezclaron 20 μl de la suspensión celular resuspendida con 80 μl de azul tripano (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) para el recuento. La muestra re recuento celular se puso en a hemocitómetro y se evaluó usando un microscopio.

30 Las membranas coriónicas se digirieron con 25 ml de solución de colagenasa al 0,75 % a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 20-40 minutos en un balanceador. Después de la digestión con colagenasa, la suspensión se filtró a través de un filtro de nailon de tamiz celular de 100 μm para retirar cualquier desecho. Se realizó centrifugación a 2.000 rpm durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante. Los sedimentos celulares se reconstituyeron con un volumen de PlasmaLyte-A que fue proporcional al tamaño del sedimento, y se mezclaron 20 μl de la suspensión celular resuspendida con 80 μl de azul tripano para el recuento. La muestra de recuento celular se puso en a hemocitómetro y se evaluó usando un microscopio.

35 Las membranas placentarias se analizaron antes de cualquier procesamiento para determinar las características iniciales de las membranas. La tabla 1 contiene el recuento celular promedio por cm^2 y los valores de viabilidad celular para la membrana amniótica y coriónica de 32 lotes de placenta.

El recuento celular promedio por cm^2 para la membrana amniótica fue de 91.381 células con una viabilidad celular promedio correspondiente de un 84,5 %. Para la membrana coriónica, el recuento celular promedio por cm^2 fue de 51.614 células con una viabilidad celular correspondiente de un 86,0 %.

40 Estos datos ilustran las cantidades de células que son útiles con ciertas realizaciones de la presente invención; por ejemplo, un producto placentario que comprende una membrana coriónica que contiene de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 200.000 células/ cm^2 .

45 Como la membrana amniótica consiste en células epiteliales y células estromales, se realizaron experimentos para determinar la relación de células epiteliales a células estromales. Se analizaron las membranas amnióticas de 3 lotes de placenta. En primer lugar, se digirió un fragmento de 5 cm x 5 cm de membrana amniótica con aproximadamente 25 ml de tripsina al 0,05 %-EDTA (Lonza, Walkersville, MD) a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ en un baño de agua durante 30 minutos. Después de la etapa de incubación, las células epiteliales se retiraron por raspado suave de las células de la membrana. Después de lavar con PBS (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY), la membrana posteriormente se digirió de la misma manera que la membrana coriónica (descrito anteriormente). Además, se digirió otro fragmento intacto de 5 cm x 5 cm de membrana amniótica usando el procedimiento convencional (descrito anteriormente) para determinar la cantidad total de células. El porcentaje de células estromales se determinó a continuación dividiendo el recuento celular de la membrana amniótica con las células epiteliales eliminadas con el recuento celular de la membrana intacta.

55 Los resultados indican que un 19 % de las células totales eran células estromales. Por lo tanto, aproximadamente 17.362 células estromales estaban presentes en la membrana amniótica con aproximadamente 74.019 células epiteliales. Estos datos indicaron que hay aproximadamente 3 veces más células estromales en membranas coriónicas en comparación con membranas amnióticas. Esta relación es coherente con ciertas realizaciones de la presente invención que proporcionan un producto placentario que comprende una membrana coriónica y una membrana amniótica, en donde la membrana coriónica comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 4

veces más células estromales respecto a la membrana amniótica.

Tabla 1 Recuento de células por cm² y valores de viabilidad celular de tejido placentario fresco de 32 donantes.

Membrana	Estadística	Recuento de células por cm ²	Viabilidad celular
Amnios	Promedio	91.381	84,5 %
	DE	49.597	3,7 %
Corion	Promedio	51.614	86,0 %
	DE	25.478	4,7 %

- 5 El segundo punto en el proceso de fabricación donde se evaluaron el recuento celular y los valores de viabilidad celular fue después de la etapa de tratamiento con antibiótico. La tabla 2 proporciona los resultados de estos análisis. Las recuperaciones de células de esta etapa para la membrana amniótica y la membrana coriónica fueron de un 87,7 % y un 70,3 %, respectivamente.

10 **Tabla 2 Recuento de células por cm², viabilidad celular y valores de recuperación de células del proceso (tratamiento antibiótico) para tejido placentario después del antibiótico de 28 donantes.**

Membrana	Estadística	Recuento de células por cm ²	Viabilidad celular	Recuperación de células del proceso
Amnios	Promedio	75.230	84,4 %	87,7 %
	DE	46.890	4,2 %	49,4 %
Corion	Promedio	33.028	85,6 %	70,3 %
	DE	18.595	4,4 %	31,1 %

Ejemplo 4 Desarrollo de un procedimiento de crioconservación de producto placentario

- 15 La crioconservación es un método que proporciona una fuente de tejidos y células vivas. Un objetivo principal de la crioconservación es minimizar los daños a los materiales biológicos durante la congelación a baja temperatura y el almacenamiento. Aunque las normas generales de crioconservación son aplicables a todas las células, tejidos y órganos, se requiere optimización del procedimiento de crioconservación para cada tipo de material biológico. La presente solicitud describe un procedimiento de crioconservación para productos de membrana placentaria que pueden reducir de forma selectiva las células inmunógenas de las membranas placentarias; y conservar la viabilidad de otras células beneficiosas que son la fuente principal de factores para promover la cicatrización.

- 20 Durante el desarrollo del método de crioconservación para membranas placentarias, los autores de la presente invención evaluaron parámetros clave de crioconservación, incluyendo el volumen de solución crioconservante, el efecto del equilibrado del tejido antes de la congelación y las tasas de refrigeración para procedimientos de congelación.

- 25 La aceptación de aloinjertos de tejido en ausencia de inmunosupresión dependerá de la cantidad de células inmunitarias satélite presentes en el tejido. La crioconservación es un procedimiento que puede utilizarse para reducir la inmunogenicidad tisular. Este procedimiento se basa en la susceptibilidad diferencial de diferentes tipos celulares a lesiones por congelación en presencia de DMSO; los leucocitos son sensibles a tasas rápidas de refrigeración. La tasa de congelación de 1 °C/min se considera óptima para células y tejidos, incluyendo células inmunitarias. Las rápidas tasas rápidas de congelación, tales como 60-100 °C/min eliminan las células inmunitarias. Sin embargo, este tipo de procedimiento es dañino para otras células tisulares, que se desean conservar de acuerdo con la presente invención. El procedimiento de crioconservación desarrollado utilizó un medio de crioconservación que contenía DMSO al 10 %, que es un componente clave que protege las células de la destrucción cuando el agua forma cristales a bajas temperaturas. La segunda etapa de crioconservación fue el completo equilibrado de la membrana placentaria en el medio de crioconservación, que se consiguió impregnando las membranas en el medio de crioconservación durante 30-60 min a 4 °C. Esta etapa permitió que el DMSO penetrara en los tejidos placentarios. Aunque hay datos en la bibliografía que muestran que el equilibrado del tejido antes de la congelación afecta a la supervivencia de las células inmunitarias (Taylor y Bank, Cryobiology, 1988,

25:1), un hallazgo inesperado fue que un equilibrado de 30-60 min de la membrana placentaria en una solución que contenía DMSO a 2-8 °C aumenta de forma selectiva la sensibilidad de las células inmunitarias a la congelación (en comparación con las células terapéuticas) de modo que este tipo de células se reduce de forma selectiva durante el proceso de congelación (por ejemplo, tasa de congelación de 1 °C/min).

- 5 Por ejemplo, los macrófagos CD14+ se eliminan de forma selectiva respecto a las células terapéuticas tales como hMSC y/o fibroblastos.

Se realizaron experimentos de mapeado de temperatura para analizar los perfiles de temperatura de las condiciones potenciales de crioconservación para los productos de membrana. Estos resultados se ilustran en la figura 1. Ocho (8) criobolsas FP-90 se llenaron con 20 ml o 50 ml de solución de crioconservación, y se colocaron sondas de temperatura dentro de cada criobolsa. El primer conjunto de parámetros (condiciones 1 a 4 de la figura 1a a la figura 1d, respectivamente) implicó una etapa de refrigeración de 30 minutos (2-8 °C) antes de la congelación (-80 °C ± 5 °C). Además, el análisis implicó congelar las criobolsas dentro de un recipiente de Styrofoam o sobre una balda del congelador. El segundo conjunto de parámetros (condiciones 5 a 8 de la figura 1e a la figura 1h, respectivamente) implicó la congelación directa (-80 °C ± 5 °C) de las criobolsas dentro de un recipiente de Styrofoam o sobre una balda del congelador. Los resultados indicaron que la condición 6 y la condición 2 mostraron las disminuciones de temperatura más graduales. Las disminuciones de temperatura graduales típicamente son deseadas para conservar la viabilidad celular. La diferencia entre la condición 6 y la condición 2 fue que la condición 2 incluía una etapa de refrigeración de 30 minutos. Por lo tanto, la disminución en la temperatura desde el inicio de la congelación hasta -4 °C, donde se produce una evolución del calor latente tras la congelación, se examinó adicionalmente. Para la condición 6, la tasa de refrigeración fue de aproximadamente -1 °C/minuto durante este periodo. La tasa de refrigeración para la condición 2 fue de aproximadamente -0,4 °C/minuto durante el mismo tramo de tiempo. Por lo tanto, se seleccionó la condición 2 para su incorporación en un proceso de crioconservación no limitante, ya que generalmente se desean tasas más bajas de refrigeración para mantener la viabilidad celular óptima.

25 La figura 2 representa los efectos del volumen de la solución de crioconservación sobre la recuperación de células del proceso (crioconservación) para la membrana coriónica. El análisis del volumen de la solución de crioconservación de 10 ml implicó 5 lotes de placenta, y el análisis del volumen de solución de crioconservación de 20 ml incluyó 3 lotes. Para el volumen de solución de crioconservación de 50 ml, se analizaron 16 lotes de placenta.

30 Como se representa en la figura 2, el volumen de 50 ml de la solución de crioconservación proporcionó una recuperación de células superior en comparación con la de 10 ml y 20 ml. Estos datos indican que un volumen del medio de crioconservación de más de 20 ml tal como aproximadamente 50 ml o más puede proporcionar un producto placentario superior de acuerdo con la presente invención.

35 Se realizaron experimentos para evaluar diferentes condiciones de congelación potenciales para maximizar la recuperación de células después del proceso de crioconservación.

La figura 3 incluye estos resultados, que representan los efectos del tiempo de refrigeración y los parámetros de congelación sobre la recuperación de células del proceso (crioconservación) para la membrana coriónica. Se analizaron tres condiciones. Estas condiciones también se ligaron a los estudios de ubicación de temperatura. La primera condición implicó la congelación directa de la unidad de producto en una balda dentro del congelador (-80 °C ± 5 °C). La segunda condición también contenía una congelación directa, pero la unidad de producto se puso en un recipiente de Styrofoam dentro del congelador. La tercera condición incluyó un periodo de refrigeración (2-8 °C) de 30 minutos antes de la etapa de congelación. Para la membrana amniótica, se evaluaron 3 lotes de placenta. Se analizaron dos (2) lotes de placenta para la membrana coriónica. Los resultados indicaron que la tercera condición fue óptima para ambos tipos de membrana.

45 Como se representa en la figura 3, un periodo de refrigeración de al menos aproximadamente 30 min proporcionó la mejor recuperación de células.

Los parámetros de crioconservación se evalúan para las membrana amniótica y coriónica y se resumen en la tabla 3 y la tabla 4. La evaluación de las recuperaciones de células y las viabilidades celulares de estos experimentos provocó la selección de los parámetros finales para el proceso de fabricación. Además, todos los valores de viabilidad celular promedio fueron de ≥ 70 %.

50

Tabla 3 Recuento de células después de descongelación por cm², viabilidad celular y valores de recuperación de células del proceso (crioconservación) para la membrana coriónica.

Parámetro	Condición ensayada	Estadística	Recuento de células por cm ²	Viabilidad celular	Recuperación de células del proceso	
Refrigerar a 2-8 °C durante 30-60 min y congelar a -80 °C ± 5 °C	Todas las condiciones	Promedio	23.217	87,3 %	102,8 %	
		DE	9.155	4,1 %	65,5 %	
		N	27	27	27	
Tratamiento con dispasa	30 min	Promedio	22.354	85,7 %	81,1 %	Sin disminución en la recuperación de células del proceso para los 45 min de tratamiento. Se estableció un intervalo de 30-45 min.
		DE	9.505	5,1 %	32,4 %	
		N	24	24	24	
	45 min	Promedio	27.125	90,6 %	172,6 %	
		DE	7.963	2,2 %	101,2 %	
		N	6	6	6	
Intervalo de tiempo de refrigeración	30 min	Promedio	23.815	86,8 %	102,2 %	El valor de recuperación del proceso fue > 80 % para el intervalo de tiempo de 60 min. Se estableció un intervalo de 30-60 min.
		DE	9681	5,2 %	68,8 %	
		N	25	25	25	
	60 min	Promedio	20.773	85,8 %	84,9 %	
		DE	7.356	4,7 %	14,4 %	
		N	5	5	5	
Temperatura de descongelación	Baño de agua a 37 °C ± 2 °C	Promedio	33.360	85,9 %	114,7 %	No se encontró diferencia significativa en la recuperación de células del proceso. Se seleccionó la condición de temp. ambiente por razones lógicas.
		DE	8497	4,0 %	38,1 %	
		N	5	5	5	
	Baño de agua a temp. ambiente	Promedio	21.298	86,8 %	96,3 %	
		DE	8.189	5,3 %	67,2 %	
		N	25	25	25	
Periodo de retención después de la transferencia a solución salina	1-15 min	Promedio	23.733	86,6 %	100,6 %	No se encontró diferencia significativa en la recuperación de células del proceso. Las membranas pueden mantenerse en solución salina durante hasta 1 h.
		DE	9.674	5,1 %	67,0 %	
		N	26	26	26	
	1 h	Promedio	20.550	87,0 %	91,4 %	
		DE	6.575	4,8 %	32,0 %	
		N	4	4	4	
Tamaño del tejido	5 cm x 5 cm	Promedio	23.391	86,1 %	99,6 %	Sin disminución en la recuperación de células del proceso del producto de 5 cm x 5 cm al producto de 2 cm x 2 cm.
		DE	8.865	5,0 %	58,7 %	
		N	23	23	23	
	2 cm x 2 cm	Promedio	23.036	88,4 %	98,7 %	Ambos tamaños fueron aceptables para su uso.
		DE	11.362	5,0 %	81,3 %	
		N	7	7	7	

Notas: cm = centímetro; min = minutos; temp. = temperatura; h = hora,

DE = desviación estándar; N = número

Tabla 4 Recuento de células después de descongelación por cm², viabilidad celular y valores de recuperación de células del proceso (crioconservación) para la membrana amniótica

Parámetro	Condición ensayada	Estadística	Recuento de células por cm ²	Viabilidad celular	Recuperación de células del proceso	Comentarios/conclusiones
Refrigerar a 2-8 °C durante 30-60 min y congelar a -80 °C ± 10 °C	Todas las condiciones	Promedio	55.709	83,4 %	64,2 %	Evaluación global
		DE	45.210	4,4 %	22,5 %	
		N	32	32	32	
Intervalo de tiempo de refrigeración	30 min	Promedio	52.173	83,1 %	63,7 %	No se encontró diferencia significativa en la recuperación de células del proceso. Se estableció un intervalo de 30-60 min.
		DE	39.750	4,5 %	21,4 %	
		N	26	26	26	
	60 min	Promedio	71.033	85,0 %	66,5 %	
		DE	66.525	3,9 %	29,3 %	
		N	6	6	6	
Temperatura de descongelación	Baño de agua a 37 °C ± 2 °C	Promedio	48.524	83,3 %	64,0 %	No se encontró diferencia significativa en la recuperación de células del proceso. Se seleccionó la condición de temp. ambiente por razones lógicas.
		DE	27.804	1,7 %	34,4 %	
		N	7	7	7	
	Baño de agua a temp. ambiente	Promedio	57.721	83,5 %	64,3 %	
		DE	49.271	4,9 %	19,0 %	
		N	25	25	25	
Periodo de retención después de la transferencia a solución salina	1-15 min	Promedio	50.873	83,1 %	65,0 %	No se encontró diferencia significativa en la recuperación de células del proceso. Las membranas pueden mantenerse en solución salina durante hasta 1 h.
		DE	38.969	3,9 %	24,2 %	
		N	26	26	26	
	1 h	Promedio	76.667	85,1 %	61,0 %	
		DE	66.565	6,2 %	14,3 %	
		N	6	6	6	
Tamaño del tejido	5 cm x 5 cm	Promedio	58.431	83,3 %	62,8 %	Sin disminución en la recuperación de células del proceso del producto de 5 cm x 5 cm al producto de 2 cm x 2 cm. Ambos tamaños fueron aceptables para su uso.
		DE	47.603	4,5 %	21,7 %	
		N	28	28	28	
	2 cm x 2 cm	Promedio	36.656	84,4 %	73,9 %	
		DT	13.175	3,4 %	29,5 %	
		N	4	4	4	

5

Estos datos son coherentes con ciertas realizaciones de la presente invención que proporcionan un producto placentario que comprende una membrana coriónica que contiene de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 60.000 o a aproximadamente 200.000 células/cm².

Ejemplo 5 Evaluación cualitativa de la viabilidad celular por tinción tisular

Las membranas amniótica y coriónica se tiñeron usando un kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD® (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) para evaluar de forma cualitativa la viabilidad celular. La tinción se realizó según el protocolo del fabricante. Se usaron segmentos de membrana de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm. La evaluación de las membranas teñidas se realizó usando un microscopio de fluorescencia. Una fluorescencia verde uniforme e intensa indicaba la presencia de células vivas, y una fluorescencia roja brillante indicaba la presencia de células muertas. Las imágenes de membrana amniótica y coriónica frescas, así como membrana amniótica y coriónica crioconservadas demostraron que el proceso de fabricación no alteraba las características fenotípicas de las membranas y la proporción de tipos celulares viables (células epiteliales y estromales) en las membranas después de la descongelación.

La figura 4 muestra imágenes representativas de la tinción Live/Dead de la capa epitelial de membrana amniótica fresca (A); la capa epitelial de membrana amniótica crioconservada (B); la capa estromal de membrana amniótica fresca (C); la capa estromal de membrana amniótica crioconservada (D); la membrana coriónica fresca (E); y la membrana coriónica crioconservada (F). Las células vivas son verdes y las células muertas son rojas.

Ejemplo 6 Ensayo de inmunogenicidad de tejido placentario

Una característica única del corion humano es la ausencia de vasos sanguíneos fetales que eviten la movilización de leucocitos desde la circulación fetal. En el lado fetal, los macrófagos residentes en la capa mesodérmica corioamniótica representan la única población de células inmunitarias. Por tanto, los macrófagos fetales presentes en el corion son una fuente principal de inmunogenicidad tisular, por lo que el corion se considera inmunógeno. En un estudio donde se usó el amnios junto con el corion para una reparación plástica de defectos conjuntivales, la tasa de éxito fue baja (De Roth Arch Ophthalmol, 1940, 23: 522). Sin limitarse a teoría alguna, los autores de la presente invención creen que la eliminación de células CD14+ de las membranas placentarias elimina la activación de linfocitos *in vitro*. Además de la presencia de macrófagos fetales, los autores de la presente invención creen que la inmunogenicidad del corion puede estar mediada por la contaminación de células sanguíneas que provienen del trofoblasto materno, que contiene vasos sanguíneos. Por tanto, el procesamiento de la membrana placentaria para uso clínico puede potenciarse por purificación del corion de las células del trofoblasto materno y la eliminación selectiva de todos los macrófagos fetales CD14+. El ensayo de inmunogenicidad puede usarse para caracterizar un producto derivado de corion como agentes terapéuticos clínicos seguros. Por ejemplo, pueden usarse dos bioensayos para ensayar la inmunogenicidad de productos placentarios fabricados: la reacción de linfocitos mezclados (MLR) y la secreción de factor de necrosis tumoral (TNF)- α inducida por lipopolisacárido (LPS).

Ejemplo 7 Reacción de linfocitos mezclados (MLR)

Una MLR es un ensayo *in vitro* ampliamente usado para ensayar la inmunogenicidad celular y tisular. El ensayo se basa en la capacidad de las células inmunitarias (respondedoras) derivadas de un individuo de reconocer el antígeno de leucocitos humanos (HLA) alogénico y otras moléculas antigénicas expresadas en la superficie de células y tejidos alogénicos (estimuladores) derivados de otro individuo cuando se mezclan juntos en un pocillo de una placa de cultivo tisular experimental. La respuesta de las células inmunitarias a la estimulación por células y tejidos alogénicos puede medirse usando una diversidad de métodos tales como secreción de citocinas particulares (por ejemplo, interleucina (IL-2), expresión de ciertos receptores (por ejemplo, IL-2R) o proliferación celular, todos los cuales son característicos de células inmunitarias activadas.

Las muestras de tejido placentario que representan diferentes etapas del proceso de fabricación descrito en la presente se usaron para el ensayo de inmunogenicidad. Estas muestras incluyeron amnios con corion y trofoblasto como material de partida y por separado coriotrofoblasto, corion, trofoblasto y amnios. Se ensayaron tejidos tanto recién purificados como crioconservados (productos finales).

Para el ensayo de MLR, se aislaron células de tejidos placentarios usando 280 U/ml de colagenasa de tipo II (Worthington, n.º cat. 4202). Los tejidos se trataron con enzima durante 60-90 min a 37 °C \pm 2 °C, y la suspensión celular resultante se filtró a través de un filtro de 100 μ m para retirar los desechos tisulares. Entonces se centrifugaron suspensiones de células individuales usando un Beckman, TJ-6 a 2.000 rpm durante 10 min y se lavaron dos veces con DPBS. El sobrenadante se descartó después de cada lavado y las células se resuspendieron en 2 ml de DMEM (Invitrogen, n.º cat. 11885) y se evaluaron para la cantidad de células y la viabilidad celular contando las células en presencia de colorante azul tripano (Invitrogen, n.º cat. 15250-061). Para la MLR, se mezclaron células derivadas de placenta con hPBMC alogénicas a una relación 1:5 en placas de cultivo de 24 pocillos en DMEM enriquecido con suero bovino fetal (FBS) al 5 % y se incubaron durante 4 días en la incubadora que contenía un 5 % de CO₂, un 95 % de humedad a 37 °C \pm 2 °C. Se usaron células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMC) en solitario como control negativo, y se usó una mezcla de dos conjuntos de hPBMC derivadas de dos donantes diferentes como control de MLR positivo. Después de 4 días de incubación, se recogieron las células de los pocillos, se lisaron usando un tampón de lisis (Sigma, n.º cat. C2978) enriquecido con cóctel inhibidor de proteasa (Roche, n.º cat. 11836153001) y se midió el IL-2R en lisados celulares usando el kit de ELISA de sIL-2R (R&D Systems, n.º cat. SR2A00) siguiendo en líneas generales el protocolo del fabricante.

El nivel de IL-2R es una medida de la activación de los linfocitos T en respuesta a moléculas inmunógenas expresadas por células alogénicas. Se muestran los resultados de 2 de los 12 experimentos representativos en la figura 5 y la figura 6. Los resultados presentados en estas figuras demostraron que la presente solicitud describe un proceso para fabricar membranas placentarias que provocan baja inmunogenicidad de los productos finales de membrana coriónica.

Como se representa en la figura 5, el proceso de fabricación reduce en serie la inmunogenicidad del producto placentario. Las muestras que representan diferentes etapas del proceso de fabricación corion+trofoblasto (CT), trofoblasto (T), amnios (AM) y corion (CM) se cocultivaron con hPBMC durante 4 días. El IL-2sR se midió en lisados celulares como un marcador de activación de linfocitos T. El control negativo muestra un nivel basal de activación de células inmunitarias: las PBMC derivadas de un donante se cultivaron en solitario. Control positivo: una mezcla de PBMC derivadas de 2 donantes diferentes.

Como se representa en la figura 6, la reducción selectiva de la inmunogenicidad resulta del presente proceso de crioconservación de producción de los presentes productos placentarios, como se evidencia por la disminución significativa en la inmunogenicidad tras la crioconservación.

Ejemplo 8 Secreción de TNF- α inducida por LPS por células de la membrana placentaria

Como se describe en la presente memoria, los macrófagos fetales presentes en el amnios y el corion son una fuente principal de inmunogenicidad tisular. Sin limitarse a teoría alguna, los autores de la presente invención creen que la eliminación de las células CD14+ de la membrana placentaria elimina la activación de linfocitos y que la reducción de los macrófagos de tejido donante alogénico disminuye el nivel de secreción de citocinas inflamatorias e inmunogenicidad tisular. Los autores de la invención también creen que la reducción de la inmunogenicidad tisular también puede alcanzarse por la reducción de TNF- α con anticuerpos anti-TNF- α o la supresión de la secreción de TNF- α por IL-10. Los macrófagos en membranas placentarias fetales responden a bacterias por secreción de citocinas inflamatorias. La secreción de TNF- α por membranas placentarias frescas *in vitro* en respuesta a LPS bacteriano es significativamente mayor en la membrana coriónica. Por tanto, los autores de la presente invención creen que la inmunogenicidad de las membranas placentarias está mediada por macrófagos, cuya cantidad y/o actividad es mayor en la membrana coriónica.

De acuerdo con la presente invención, la reducción selectiva de los macrófagos es un procedimiento opcional a la reducción selectiva de la inmunogenicidad de la membrana amniótica y coriónica, que permite el uso de ambas membranas alogénicas para aplicaciones clínicas. El ensayo de macrófagos funcionales en un producto placentario se usa en esta ocasión como un ensayo para probar la inmunogenicidad (por ejemplo, en la producción o antes del uso clínico) basándose en los hechos de que: los macrófagos son la fuente de inmunogenicidad en membranas coriónicas. Los macrófagos en membranas derivadas de placenta responden a LPS bacteriano por secreción de altos niveles de TNF- α ; y TNF- α es una citocina crítica implicada en la respuesta inmunitaria y el rechazo de tejido de aloinjerto. Por lo tanto, la secreción de TNF- α por membranas derivadas de placenta en respuesta a LPS se usa en esta ocasión para caracterizar la inmunogenicidad tisular y para el cribado previo al uso.

Ejemplo 9 Establecimiento del nivel permitido de secreción de TNF- α inducida por LPS por membranas coriónicas

Los datos de informes publicados respecto al nivel de TNF- α , que se asocia con la ausencia de respuesta inmunitaria o respuesta inmunitaria insignificante en una diversidad de sistemas experimentales se presentan en la tabla 5. Estos datos indican que un nivel de TNF- α por debajo de 100 pg/ml se correlaciona con una baja respuesta inmunitaria. La capacidad de la membrana amniótica y coriónica de producir TNF- α de forma espontánea y en respuesta a bacterias o LPS bacteriano *in vitro* se ha demostrado por varios investigadores. La tabla 6 resume dichos datos. La secreción espontánea más baja de TNF- α por membrana amniótica de aproximadamente 70 pg/cm² de la membrana se presentó por Fortunato et al. (Am J Reprod Immunol, 1994, 32:184). Todos los informes también demostraron que las membranas placentarias frescas secretan grandes cantidades de TNF- α en respuesta a bacterias o LPS bacteriano (tabla 6), que se atribuye a la presencia de macrófagos funcionales viables.

Tabla 5

Descripción del sistema experimental	Niveles de TNF- α asociados con la ausencia/reducción de respuesta inmunitaria	Comentarios	Referencias
<p>Inhibición inducida por IL-10 de MLR <i>in vitro</i>.</p> <p>El TNF se midió en sobrenadante de cultivo tisular por ELISA.</p>	<p>Media 260 pg/ml</p>		<p>Wang et al., Transplantation, 2002, 74:772</p>
<p>La MLR usando explantes tisulares de piel (0,02 cm² por pocillo) como estimuladores en presencia o ausencia de IL-10 (ensayo de explante de piel). Se evaluó la destrucción de tejido de piel al microscopio, y la gravedad se asignó basándose en el daño tisular histopatológico.</p>	<p>Media 100 pg/ml</p>		
<p>Producción endógena de TNF en MLR en presencia o ausencia de anticuerpos anti-TNF. Se evaluaron los niveles de TNF usando el ensayo de citotoxicidad de WEHI-164.</p>	<p>~0,04 U/ml para el control negativo y MLR en presencia de anticuerpos anti-TNF, que se correlacionaron con ausencia de inhibición o inhibición significativa de proliferación de linfocitos</p>	<p>No se proporciona la actividad TNF por mg.</p>	<p>Shalaby et al., J Immunol, 1988, 141:499</p>
<p>Niveles de TNF en líquido BAL de isoinjertos de pulmón, aloinjerto no modificado y aloinjerto con macrófagos alveolares (AM) reducidos en ratas.</p>	<p>Isoinjerto: por debajo de la detección; aloinjerto con AM reducidos: ~15 pg/ml de BAL (total 75 pg/5 ml de BAL)</p>	<p>Aloinjerto no modificado: ~45 pg/ml (inmunógeno)</p>	<p>Sekine et al., J Immunol, 1997, 159:4084</p>
<p>Niveles de TNF en MLR después de 48 horas en presencia o ausencia de productos finales de glucación avanzada (inhibidores de MLR).</p>	<p>~<200 pg/ml de TNF correlacionado con una inhibición completa de MLR</p>		<p>Ohashi et al., Clin Immunol, 2010, 134:345</p>
<p>Niveles de TNF en MLR.</p>	<p><100 pg/ml de TNF en MLR con donantes de HLA coincidente (control, sin estimulación)</p>		<p>Toungouz et al., Hum Immunol, 1993, 38:221</p>
<p>Actividad TNF en MLR cuando se incubaron fragmentos de aloinjertos de piel crioconservados (~0,2 cm²) con hPBMC durante 24 horas. Control positivo: hPBMC+LPS; negativo: hPBMC en solitario.</p>	<p>Control negativo ~20 U de actividad TNF; MLR con explantes de piel: 0-40 U; Control positivo: 600 U</p>	<p>La unidad de actividad se calculó como TNF en ng/ml dividido por la DO a 570 nm para el mismo pocillo experimental</p>	<p>Lomas et al., Cell Tissue Bank, 2004, 5:23.</p>

Descripción del sistema experimental	Niveles de TNF- α asociados con la ausencia/reducción de respuesta inmunitaria	Comentarios	Referencias
Trascurso del tiempo de citocinas en MLR, incluyendo TNF.		TNF óptimo después de 24 horas: ~150 pg/ml	Jordan y Ritter, J Immunol Meth, 2002, 260:1
La MLR usando explantes tisulares de piel (0,02 cm ² por pocillo) como estimuladores en presencia o ausencia de anticuerpos anti-TNF (ensayo de explante de piel). Se evaluó la destrucción de tejido de piel al microscopio, y la gravedad se asignó basándose en el daño tisular histopatológico.	Para ausencia de destrucción de piel: 0,5-1,1 pg/ml para respondedores de HLA compatible, y 2,6-1376 pg/ml o MLR no coincidente	Recálculo por 1 cm ² de tejido de piel: el nivel más bajo de TNF no inmunógeno es de 100 pg/cm ²	Dickinson et al., Cytokine, 1994, 6:141

Tabla 6

Descripción del sistema experimental	Niveles de TNF secretados por membranas placentarias frescas en cultivo	Comentarios/recálculos de los niveles más bajos de TNF por cm ²	Referencias
Secreción de TNF por tejido amniótico y coriónico "fresco" (1,44 cm ²) incubado durante 24 horas en presencia o ausencia de LPS (500 ng/ml).	Corion: basal 3,3 \pm 0,46 ng/cm ² , inducido por LPS: 150-250 ng/cm ² Amnios: basal 2,5 \pm 1,3 ng/cm ² , inducido por LPS: ~50 ng/cm ²	El nivel más bajo de TNF para el amnios es de 1200 pg/cm ²	Zaga et al., Biol Reprod, 2004, 71:1296
Secreción de TNF por tejido amniótico y coriónico "fresco" (discos de 1,8 cm de diámetro: 2,5 cm ²) incubado durante 24 horas en presencia o ausencia de <i>E. coli</i> en 1 ml de medio.	Basal ~1-2,5 pg/ μ g de proteína total en el medio tanto para amnios como para corion; inducido por <i>E. coli</i> : amnios \rightarrow 29,2 (14,5-35,3) pg y corion \rightarrow 53,15 (40-94,2) pg por μ g de proteína total	El nivel más bajo de TNF para el amnios es de 800 pg/cm ²	Zaga-Clavellina et al., Reprod Biol Endocrinol, 2007, 5:46
Secreción de TNF por tejido amniótico y coriónico "fresco" (corion 8-10 mg de tejido/ml; amnios 5-7 mg/ml, 0,02-0,04 cm ²) incubado durante 20 horas en presencia o ausencia de LPS (5 μ g/ml).	Basal: ~2-64 U/ml para 8-10 mg de corion; <1 U/ml para 5-7 mg de amnios; inducido por LPS: >100 U/10 mg para corion y ~15-17 U/10 mg para amnios	1 unidad = ~100-200 pg/ml; El nivel más bajo de TNF para el amnios es <100 pg/ml correspondiente a <2.500 pg/cm ²	Paradowska et al., Placenta, 1997, 18:441

Descripción del sistema experimental	Niveles de TNF secretados por membranas placentarias frescas en cultivo	Comentarios/recálculos de los niveles más bajos de TNF por cm ²	Referencias
Secreción de TNF por amnios "fresco" (0,57 cm ²) en 0,8 ml incubados durante 24 horas en presencia o ausencia de LPS (50 ng/ml).	Amnios: Basal →40 pg/ml, inducido por LPS →410 pg/ml	El nivel más bajo de TNF para amnios fresco es de ~70 pg/cm²	Fortunato et al., Am J Obstet Gynecol, 1996, 174:1855
Secreción de TNF por tejido amniótico y coriónico "fresco" (4 cm ²) incubado durante 24 horas en presencia o ausencia de LPS (1-1000 ng).	Basal: Amnios ~7-13 ng/ml/g de tejido); Corion ~18 ng/ml/g de tejido inducido por LPS (1000 ng/ml): Amnios ~14 ng/ml/g), corion ~27 ng/ml/g	Amnios es de 5-7 mg corresponde a ~0,02-0,04 cm ² ; 1 g es ~6 cm ² ; El nivel más bajo de TNF para el amnios es de ~1000 pg/cm ²	Thiex et al., Reprod Biol Endocrinol, 2009, 7:117

Ejemplo 10 Ensayo de inmunogenicidad de secreción de TNF- α inducida por LPS

Fragmentos de 2 cm x 2 cm de membranas derivadas de placenta que representan los intermedios de producción y los productos placentarios finales se colocaron en medio de cultivo tisular y se expusieron a LPS bacteriano (1 μ g/ml) durante 20-24 h. Después de 24 horas, se recogió el sobrenadante de cultivo tisular y se ensayó para la presencia de TNF- α usando un kit de ELISA de TNF- α (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usaron hPBMC humanas (SeraCare) que se sabe que contienen monocitos que responden a LPS por secreción de altos niveles de TNF- α como control positivo en el ensayo. Las hPBMC y los tejidos placentarios sin LPS también se incluyeron como controles en el análisis. En este ensayo, el TNF detectado en el medio de cultivo de más de 70 pg/cm² (correspondiente a 280 pg/ml) para la secreción de TNF- α tanto espontánea como inducida por LPS se consideró inmunógeno.

Los bajos niveles de TNF- α y la ausencia de la respuesta a LPS por AM y CM indica la ausencia de macrófagos funcionales viables que son la fuente principal de inmunogenicidad para membrana amniótica y coriónica. Los resultados de este ensayo demostraron una correlación con los datos de MLR: los tejidos que producen altos niveles de TNF- α en respuesta a LPS son inmunógenos en el ensayo de MLR (figura 7A y figura 7B para la secreción de TNF- α ; figura 9, C-MLR).

Como se representa en la figura 7A y la figura 7B, el proceso de fabricación reduce en serie la inmunogenicidad del producto placentario. Las muestras que representan diferentes etapas del proceso de fabricación (amnios+corion+trofoblasto (ACT), corion+trofoblasto (CT), amnios (AM) y corion (CM)) se incubaron en presencia de LPS durante 24 h, y después de esto los sobrenadantes de cultivo tisular se ensayaron para el TNF- α por ELISA. Los tejidos cultivados en medio sin LPS muestran el nivel basal de secreción de TNF- α . Las PBMC, que se sabe que secretan altos niveles de TNF, se usaron como control positivo.

El coriotrofoblasto (CT), que secretaba altos niveles de TNF- α (figura 7B), se ensayó en MLR frente a dos donantes de PBMC diferentes. Las células CT se cocultivaron con PBMC durante 4 días. El IL-2 α R se midió en lisados celulares como un marcador de activación de linfocitos T. Control positivo: una mezcla de PBMC derivadas de 2 donantes diferentes.

La figura 7C muestra que preparaciones que producen altos niveles de TNF- α son inmunógenas. El coriotrofoblasto (CT), que secretaba altos niveles de TNF- α (figura 7, B), se ensayó en MLR frente a dos donantes de PBMC diferentes. Las células CT se cocultivaron con PBMC durante 4 días. El IL-2 α R se midió en lisados celulares como un marcador de activación de linfocitos T. Control positivo: una mezcla de PBMC derivadas de 2 donantes diferentes.

Ejemplo 11 Análisis de células placentarias por FACS

Sabiendo la composición celular de las membranas coriónicas es importante desarrollar una comprensión completa de las funciones potenciales funcionales en la cicatrización de heridas y la inmunogenicidad. Los informes previos demostraron que el corion contiene múltiples tipos celulares. Además de los fibroblastos, se identificaron células estromales en el corion. Aunque no hay vasos sanguíneos fetales dentro de las membranas coriónicas, comprenden macrófagos fetales residentes. La cercana proximidad a la circulación sanguínea materna y la decidua proporciona una fuente potencial de células inmunógenas (leucocitos maternos y células de

trofoblasto) y, por lo tanto, son una fuente potencial de inmunogenicidad. Para investigar la composición celular del corion, se realizó análisis FACS.

Ejemplo 11.1 Procedimiento FACS: Preparación de suspensión de células individuales

5 Se usaron membranas coriónicas purificadas para el análisis fenotípico celular mediante FACS. Las células del corion se aislaron usando 280 U/ml de colagenasa de tipo II (Worthington, n.º cat. 4202). Los tejidos se trataron con enzima durante 60-90 min a 37 °C ± 2 °C, y la suspensión celular resultante se filtró a través de un filtro de 100 µm para retirar los desechos tisulares. Entonces se centrifugaron suspensiones de células individuales usando un Beckman TJ-6 a 2000 rpm durante 10 min y se lavaron dos veces con DPBS. El sobrenadante se descartó después de cada lavado, y las células se resuspendieron en 2 ml de tampón de tinción FACS (DPBS + 0,09 % de NaN₃ + 1 % de FBS).

Ejemplo 11.2 Inmunomarcaje de células para marcadores celulares específicos

15 Una vez se preparó la suspensión de células individuales de acuerdo con el ejemplo 10.1, se trató un mínimo de 1 x 10⁵ células en 100 µl de tampón de tinción FACS con anticuerpos marcados con colorante fluorescente. La tabla 7 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 centrífuga Beckman TJ-6. Las células entonces se resuspendieron en 400 µl de tampón de tinción FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACSCalibur. Para evaluar la viabilidad celular, se añadieron 10 µl de reactivo 7-AAD (BD, n.º cat. 559925) justo después del análisis FACS inicial y se analizaron de nuevo. Para la tinción intracelular, las células se permeabilizaron y se marcaron siguiendo las recomendaciones del fabricante (BD Cytotfix/Cytoperm, n.º cat. 554714) y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACSCalibur.

Tabla 7 Descripción de reactivos usados para la caracterización de células placentarias por FACS.

Anticuerpo de marcaje celular y tipo de marcador	N.º cat.	Volumen de solución de anticuerpo usado	Tipo de marcador celular	Especificidad de marcador celular
Isotipo IgG1-PE	BD 559320	5 µl	Superficie celular	Control de isotipo
CD105-PE	Caltag MHCD10504	20 µl	Superficie celular	Marcador de MSC
CD166-PE	BD 559263	80 µl	Superficie celular	Marcador de MSC
CD45-PE	BD 555483	10 µl	Superficie celular	Marcador de células hematopoyéticas
Isotipo IgG2a-PE	BD 555574	2 µl	Superficie celular	Control de isotipo
CD14-PE	BD 555398	20 µl	Superficie celular	Marcador de monocitos
HLA-DR-PE	BD 556644	20 µl	Superficie celular	HLA de clase II específico para células presentadoras de antígeno
Isotipo IgG1-FITC	BD555748	5 µl	Superficie celular	Control de isotipo
CD86-FITC	BD 557343	20 µl	Superficie celular	Marcador coestimulador inmunitario
CD40-FITC	BD 556624	20 µl	Superficie celular	Marcador coestimulador inmunitario

Anticuerpo de marcaje celular y tipo de marcador	N.º cat.	Volumen de solución de anticuerpo usado	Tipo de marcador celular	Especificidad de marcador celular
Isotipo IgG1-sin marcar	Dako X0931	10 µl	Intracelular	Control de isotipo
Citoqueratina 7-sin marcar	Dako M7018	2 µl	Intracelular	Marcador de trofoblasto
De conejo anti-ratón FITC	Dako F0261	5 µl	Intracelular	Anticuerpo secundario

Ejemplo 12 Análisis fenotípico de células placentarias

El análisis FACS de suspensiones de células individuales de membranas coriónicas demuestra que ambas membranas contienen células que expresan marcadores específicos para células madre mesenquima (remítase a la tabla 8), lo que implica la presencia de células estromales. Además, se detectaron varios marcadores de inmunogenicidad, que se expresan muy probablemente en macrófagos placentarios CD14+. Los intervalos de % para los diferentes marcadores son amplios. Pueden explicarse por: 1) alta variabilidad en la cantidad de células entre los donantes de placenta; y 2) cuestiones técnicas, que incluyen la presencia de desechos celulares y tisulares elevados y variables en la suspensión celular. Aunque los desechos pueden descartarse, las partículas de desecho que son comparable con células en tamaño afectarán a la exactitud del % calculado para cada marcador ensayado. Además, la tabla 9 proporciona una análisis FACS de células de las membranas coriónicas que se cultivaron un 10 % de FBS en DMEM a 37 °C ± 2 °C hasta confluencia (células en pase 0). Estos datos demostraron que las células derivadas de membranas coriónicas retenían un fenotipo similar a las MSC después del cultivo. En conclusión, la presencia de células estromales en tejidos placentarios se confirmó por análisis FACS.

Estos datos son coherentes con ciertas realizaciones de la presente invención que proporcionan un producto placentario que comprende una membrana coriónica que contiene MSC.

Tabla 8 Caracterización de la composición celular de membranas placentarias basada en marcadores CD selectivos.

	Marcador	Corion (intervalo de %)
Marcadores de MSC	CD105	6,4-78,5
	CD166	4,8-51,5
Marcadores de células hematopoyéticas	CD14	0,9-6,1
	CD45	4,6-14,7
Marcadores coestimuladores inmunitarios	HLA-DR	0-14,7
	CD86	4,9-22,5
	CD40	2-5,8
Marcador de trofoblasto	Citoqueratina-7	2,71-23,07

Tabla 9 Análisis FACS de células cultivadas (pase 0) del lote de placenta D16.

Marcador de superficie celular	Corion (%)
CD45	0,53
CD166	82,62
CD105	86,73

Marcador de superficie celular	Corion (%)
CD49a	92,26
CD73	94,57
CD41a	-0,05
CD34	-0,25
HLA-DR	-0,19
CD19	-0,22
CD14	-0,27
CD90	98,00

Ejemplo 13 Capacidad de diferenciación de células derivadas de la membrana coriónica

Las células terapéuticas, 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 muestran la capacidad de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y condroblastos.

La expresión de marcadores celulares específicos ya se ha descrito en el ejemplo 12. 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 $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ y se expandieron.

La figura 8-A muestra una imagen representativa de células en fase 2, que demuestra la capacidad de las células de adherirse a plástico de cultivo tisular. Como una comparación, se muestra una imagen representativa de MSC aisladas y expandidas a partir de aspirado de médula ósea humana en la figura 8-B.

La capacidad de diferenciación osteogénica 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'-indolilfosfato (BCIP) y cloruro de nitroazul de tetrazolio (NTP). BCIP se hidroliza por fosfatasa alcalina para formar un intermedio que experimenta dimerización para producir un colorante índigo. El NBT se reduce en el 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. La figura 8-C muestra una imagen representativa de células en fase 2 de tinción positiva para fosfatasa alcalina.

Ejemplo 14 Análisis FACS de CD45+ en vivo

Como CD45 es un marcador general para células hematopoyéticas y, por lo tanto, un marcador para la presencia de células inmunógenas, la presencia de células CD45+ puede correlacionarse bien con la cantidad de inmunogenicidad que tiene un tejido. Un estudio inicial, de hecho, mostró una correlación entre la cantidad de inmunogenicidad medida mediante un ensayo de MLR *in vitro* de tejido placentario en diversas fases dentro del proceso de fabricación (como se describe previamente), y la cantidad de células CD45+ se determinó mediante análisis FACS. Como la figura 9 demuestra, las membranas que activan la expresión de altos niveles de IL-2sR en hPBMC respondedoras en MLR también contenían un alto porcentaje de células CD45+, lo que indica que la inmunogenicidad de las membranas placentarias puede estar correlacionada con la cantidad de células CD45+. Estudios adicionales revelaron, sin embargo, que la cuantificación de células CD45+ mediante FACS únicamente mostraba una alta variabilidad que no permitía establecer un umbral de seguridad para las células CD45+ en membranas placentarias. Por consiguiente, los autores de la invención evaluaron su la viabilidad de las células CD45+ está correlacionada o no con la inmunogenicidad.

Para eliminar algo de la variabilidad en las mediciones de CD45+ mediante FACS, se evaluó la viabilidad de las células CD45+, ya que las células CD45+ muertas no contribuyen a la inmunogenicidad. Para asegurar una evaluación exacta de las células CD45+ vivas, se realizó un experimento piloto en que se añadió una suspensión de células individuales de membrana amniótica con una concentración conocida de células CD45+ vivas (hPBMC) que variaba de un 1,25 % a un 20 % teórico (0,75-12 % - % real de células añadidas) de la concentración total de células en suspensión. Las células se tiñeron con anticuerpo contra CD45-PE a determinadas concentraciones

(remítase a la tabla 10), se incubaron con el reactivo de ensayo de viabilidad celular 7-AAD, y se analizaron usando un BD FACSCalibur. La tabla 10 demuestra que la recuperación de cantidades conocidas de células CD45+ no era correcta (4.ª columna en la tabla). Por ejemplo, aunque se añadió un 12 % de PBMC en una suspensión de células individuales de membrana amniótica, se recuperó únicamente un 4,26 % de las células CD45+ de acuerdo con el análisis FACS (diferencia de >60 % de la adición real). Para correlacionarlo con la inmunogenicidad, también se realizó MLR en paralelo. En resumen, se cocultivaron suspensiones de células individuales de membrana amniótica con adiciones de diversas cantidades de hPBMC vivas con otro donante de PBMC en la MLR. La figura 10 representa una correlación entre la cantidad de células CD45+ presentes en suspensiones celulares derivadas de amnios y la inmunogenicidad en MLR *in vitro*. La tabla 10 y la figura 10 muestran que las suspensiones con adiciones de mayores cantidades de células CD45+ vivas produjeron mayor inmunogenicidad medida por la expresión de IL-2sR en el donante respondedor de hPBMC.

Tabla 10 Experimentos de % de recuperación de CD45+.

Descripción de la muestra (en % de tipos celulares en la mezcla)	% de células CD45+ (detectadas por FACS)	Adición real (%, basado en un 60 % de células CD45+ en este lote de hPBMC)	% de diferencia de la adición real	Inmunogenicidad de la suspensión celular (ensayada en MLR y expresada como IL-2R en pg/ml)
100 % de amnios	0,65	N/A	N/A	20,23
0 % de PBMC	N/A	N/A	N/A	15,6 (control negativo)
100 % de PBMC	61,51	N/A	N/A	86,31 (control positivo)
20 % de PBMC + 80 % de amnios	4,26	12	64,5 %	24,38
10 % de PBMC + 90 % de amnios	2,24	6	62,7 %	21,17
5 % de PBMC + 95 % de amnios	1,7	3	43,3 %	16,75
2,5 % de PBMC + 97,5 % de amnios	1,36	1,5	No calculado*	15,9
1,25 % de PBMC + 98,75 % de amnios	1,06	0,75	No calculado*	12,27

Notas: N/A - no aplicable; *No calculado - los valores están cerca de los límites de detección del método.

Ejemplo 15 Análisis de matrices de proteínas

Los perfiles de proteínas de membrana amniótica y coriónica se investigaron usando una matriz de quimioluminiscencia SearchLight Multiplex. Se investigó la presencia de proteínas en extractos de membrana tisular y secretadas por tejidos en medio de cultivo. Por motivos de comparación, se ensayaron dos productos disponibles en el mercado que contienen células vivas, Apligraf y Dermagraft.

Ejemplo 15.1 Dermagraft

La membrana Dermagraft se descongeló y se lavó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La membrana Dermagraft se cortó en fragmentos de 7,5 cm². Para los lisados tisulares, se congeló rápidamente un fragmento de 7,5 cm² de membrana en nitrógeno líquido, seguido de pulverización usando un mortero y mano de mortero. El tejido triturado se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y se añadieron 500 µl de tampón de lisis (Cell Signaling Technologies, n.º cat. 9803) con inhibidor de proteasa (Roche, n.º cat. 11836153001) y se incubó en hielo durante 30 min con agitación vorticial frecuente. La muestra entonces se centrifugó a 16.000 g durante 10 min. El sobrenadante se recogió y se envió para el análisis de matriz de proteínas por Aushon Biosystems. Para el cultivo tisular, se sembró un fragmento de 7,5 cm² de membrana en un pocillo de una placa de 12 pocillos y se añadieron 2 ml de DMEM + HSA al 1 % + antibiótico/antimicótico y se incubó a 37 °C ± 2 °C durante 3, 7 o 14 días. Después de la incubación, el tejido y el medio de cultivo se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml y se

centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante de cultivo se recogió y se envió para el análisis de matriz de proteínas por Aushon Biosystems.

Ejemplo 15.2 Apligraf

5 La membrana Apligraf se cortó en fragmentos de 7,3 cm². Para los lisados tisulares, se congeló rápidamente un fragmento de 7,3 cm² de membrana en nitrógeno líquido, seguido de pulverización usando un mortero y mano de mortero. El tejido triturado se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se añadieron 500 µl de tampón de lisis (Cell Signaling Technologies, n.º cat. 9803) con inhibidor de proteasa (Roche, n.º cat. 11836153001) y se incubó en hielo durante 30 min con agitación vorticial frecuente. La muestra entonces se centrifugó a 16.000 g durante 10 min. El sobrenadante se recogió y se envió para el análisis de matriz de proteínas por Aushon Biosystems. Para el cultivo tisular, se sembró un trozo de 7,3 cm² de membrana en un pocillo de una placa de 12 pocillos y se añadieron 2 ml de DMEM + HSA al 1 % + antibiótico/antimicótico y se incubó a 37 °C ± 2 °C durante 3, 7 o 14 días. Después de la incubación, el tejido y el medio de cultivo se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante de cultivo se recogió y se envió para el análisis de matriz de proteínas por Aushon Biosystems.

15 Ejemplo 15.3 Membranas coriónicas

Las membranas coriónicas se aislaron y envasaron a -80 °C ± 5 °C de acuerdo con los protocolos del fabricante descritos en la presente memoria en el ejemplo 2. Las membranas envasadas entonces se descongelaron en un baño de agua a 37 °C ± 2 °C y se lavaron 3 veces con DPBS. Las membranas se cortaron en fragmentos de 8 cm². Para los lisados tisulares, se congeló rápidamente un fragmento de 8 cm² de membrana en nitrógeno líquido, seguido de pulverización usando un mortero y mano de mortero. El tejido triturado se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se añadieron 500 µl de tampón de lisis (Cell Signaling Technologies, n.º cat. 9803) con inhibidor de proteasa (Roche, n.º cat. 11836153001) y se incubó en hielo durante 30 min con agitación vorticial frecuente. El lisado tisular entonces se centrifugó a 16.000 g durante 10 min. El sobrenadante se recogió y se envió para el análisis de matriz de proteínas por Aushon Biosystems. Para el cultivo tisular, se sembró un fragmento de 8 cm² de membrana en un pocillo de una placa de 12 pocillos y se añadieron 2 ml de DMEM + HSA al 1 % + antibiótico/antimicótico y se incubó a 37 °C ± 2 °C durante 3, 7 o 14 días. Después de la incubación, el tejido y el medio de cultivo se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante de cultivo se recogió y se envió para el análisis de matriz de proteínas por Aushon Biosystems.

30 El ensayo inicial consistía en un análisis de 36 proteínas que son importante para la cicatrización de heridas. La lista de proteínas identificadas se describe en la tabla 11.

Tabla 11 Lista de proteínas secretadas para el análisis.

Grupo de proteínas basado en funcionalidad		Comentarios
Metaloproteasas	Metaloproteinasa de matriz 1 (MMP1), MMP2, 3, 7, 8, 9, 10, 13	Degradación de matriz y factor de crecimiento; facilita la migración celular.
Inhibidores de MMP	Inhibidores tisulares de MMP (TIMP1 y 2)	Tiene actividad angiogénica; puede colocarse en el grupo de "factores angiogénicos".

Grupo de proteínas basado en funcionalidad		Comentarios
Factores angiogénicos	Angiotensina-2 (Ang-2); Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); Factor de crecimiento epidérmico unido a heparina (HB-EGF); EGF; FGF-7 (también conocido como factor de crecimiento de queratinocitos-KGF); Factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) AA, AB, y BB; Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), VEGF-C y VEGF-D; Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL); Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); Factor de crecimiento placentario (PIGF); Factor derivado de epitelio pigmentado (PEGF); Trombopoyetina (TPO)	La mayoría de estos factores también tienen actividades estimuladoras del crecimiento y la migración y pueden colocarse en un grupo de factores de crecimiento.
Inhibidor de proteasa/transportador de proteínas	Alfa-2-macroglobulina	Inhibe la actividad proteasa; regula la actividad del factor de crecimiento.
Factores de crecimiento	Véase "factores angiogénicos" + factor de crecimiento transformante alfa (TGF-a)	Véase "factores angiogénicos".
Citocinas	Adiponectina (Acrp-30)	Afecta a las funciones de los queratinocitos.
	Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF)	Protección contra infecciones.
	Antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1RA)	Regula la actividad de la citocina inflamatoria IL-1.
	Factor inhibidor de leucemia (LIF)	Respalda los factores de crecimiento angiogénicos.
Quimiocinas	SDF-1beta	Atrae células endoteliales y otras células madre desde la circulación hasta el sitio de herida.
Reguladores de IGF	Proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina (IGFBP1, 2, 3)	Regula la actividad de IGF.

Ejemplo 15.4 Expresión de proteínas en los presentes productos placentarios

Los análisis de los datos preliminares de la matriz de proteínas mostraron que la mayoría de los factores de ensayo seleccionados (véase la tabla 11) se expresaban en membrana amniótica, membrana coriónica, Apligraf y Dermagraft.

5

Se identificaron tres proteínas como únicas para la membrana coriónica que son indetectables en Apligraf y Dermagraft. Estas proteínas son EGF, IGFBP1 y adiponectina). La figura 11 representa la expresión de EGF (A), IGFBP1 (B) y adiponectina (C) en membrana amniótica o coriónica. CM75 y CM78 son productos placentarios de la presente invención (por ejemplo, crioconservados), AM75 y AM78 son productos de membrana amniótica crioconservados. Los autores de la invención creen que estas proteínas facilitan la eficacia terapéutica de los presentes productos placentarios para la cicatrización de heridas.

10

Estos datos son coherentes con ciertas realizaciones de la presente invención que proporcionan un producto

placentario que comprende una membrana coriónica que contiene EGF, IGFBP1 y/o adiponectina.

Ejemplo 16 Se secretan proteínas de cicatrización de heridas durante un mínimo de 14 días

5 Los productos placentarios de la presente invención muestran un efecto duradero, deseado para los tratamientos de cicatrización de heridas. La matriz extracelular y la presencia de células viables dentro de la membrana amniótica descrita en esta invención permiten que haya un cóctel de proteínas que se sabe que son importantes para la cicatrización de heridas presentes durante al menos 14 días. Las membranas amnióticas se descongelaron y se sembraron en pocillos de cultivo tisular y se incubaron a 37 °C ± 2 °C durante 3, 7 y 14 días. En cada punto temporal, se recogió una muestra del sobrenadante de cultivo y se midió a través de análisis de matriz de proteínas como se describe en el ejemplo 15. La tabla 12 ilustra el nivel de diversos factores secretados en sobrenadantes de cultivo tisular de dos donantes de membranas coriónicas a los 3, 7 y 14 días medido a través de análisis de matriz de proteínas.

Tabla 12 Niveles de proteínas secretadas en sobrenadantes de cultivo de tejido coriónico en diferentes puntos temporales (pg/ml).

	Día 3	Día 7
hACRP30	298,4	614,3
hAlfa2Macroglobulina	34 480,5	6952,5
hANG2	0,0	2,0
hEGF	0,7	0,4
hFGF	84,3	13,5
hFibronectina	37.510,9	41.871,4
hHBEGF	102,6	40,0
hHGF	1382,9	1715,4
hIGFBP1	201,6	201,0
hIGFBP2	62,7	172,9
hIGFBP3	778,1	812,4
hIL1ra	30.037,4	556,1
hKGF	4,2	2,4
hMMP1	32.388,5	67.665,6
hMMP10	4016,4	4140,1
hMMP13	13,3	0,0
hMMP2	768,8	1230,5
hMMP3	1294,7	2646,0
hMMP7	14,7	43,7
hMMP8	95,9	249,4
hMMP9	10.034,6	29.201,5
hNGAL	1968,1	2608,9
hPDGFAA	18,6	21,8
hPDGFAB	6,2	55,5
hPDGFBB	15,1	5,2

	Día 3	Día 7
hPEDF	9216,2	576.962,0
hSDFib	85,9	15,3
hTGFa	0,0	0,0
hTGFb1	377,5	410,9
hTGFb2	11,2	20,7
hTIMP1	12.279,0	15.562,7
hTIMP2	216,7	419,6
hTSP1	223,1	0,0
hTSP2	42,7	210,7
hVEGF	53,1	45,9
hVEGFC	197,4	182,7

Ejemplo 17 Interferón 2 α (IFN-2 α) y factor de crecimiento transformante- β 3 (TGF- β 3)

5 Los productos placentarios descritos en esta invención se han analizado para la presencia de IFN-2 α y TGF- β 3. En resumen, después de descongelarlas, las membranas se homogeneizaron y centrifugaron a 16.000 g para recoger los sobrenadantes resultantes. Los sobrenadantes se analizaron en un kit de ELISA disponible en el mercado de MabTech (IFN-2 α) y R&D Systems (TGF- β 3).

La figura 12 muestra la expresión significativa de IFN-2 α (A) y TGF- β 3 (B) en homogenizados celulares de membrana coriónica.

10 Sin limitarse a teoría alguna, el interferón-2 α y el TGF- β 3 puede estar ayudando a la prevención de la formación de cicatrices y contracturas. El IFN-2 α puede tener la función de disminuir la síntesis de colágeno y fibronectina y la contractura de heridas mediada por fibroblastos.

Ejemplo 18 Proteínas de reparación tisular en membranas coriónicas

Los homogenizados de membrana coriónica se analizaron para la presencia de proteínas que son importante en la reparación tisular.

15 Las membranas coriónicas descritas en esta invención se han analizado para la presencia de proteínas de reparación tisular. En resumen, las membranas amnióticas se incubaron en DMEM + 10 % de FBS durante 72 h. Las membranas entonces se homogeneizaron en un homogeneizador de microesferas con el medio de cultivo. Los homogenizados se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron en kits de ELISA disponibles en el mercado de R&D Systems. **¡Error! No es una autorreferencia de marcación válida.** muestra la expresión significativa de BMP-2, BMP-4, PLAB, PIGF e IGF-1 en varios donantes de membranas coriónicas.

25 Sin limitarse a teoría alguna, los autores de la invención creen que la eficacia de los presentes productos placentarios para la reparación de heridas se debe, en parte, a la función de BMP, IGF-1 y PIGF en el desarrollo y homeostasis de diversos tejidos mediante la regulación de procesos celulares clave. BMP-2 y BMP-4 pueden estimular la diferenciación de 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 está mediando el desarrollo embrionario. El factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1) puede promover la proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras. El factor de crecimiento derivado de placenta (PIGF) puede actuar como mitógeno para osteoblastos.

Ejemplo 19 MMP y TIMP

30 Tanto las MMP como las TIMP están entre los factores que son importantes para la cicatrización de heridas. Sin embargo, la expresión de estas proteínas debe estar muy regulada y coordinada. El exceso de MMP frente a TIMP es un marcador de una mala cicatrización de heridas crónicas. Se investigó la expresión de MMP y TIMP y su relación en membrana amniótica y membrana coriónica y se comparó con el perfil de expresión en Apligraf y Dermagraft.

Los resultados mostraron que todas las membranas expresan MMP y TIMP; la relación en los productos placentarios y las membranas amnióticas descongelados es significativamente inferior. Por lo tanto, los productos placentarios (que opcionalmente incluyen membranas coriónicas) serán más beneficiosos para la cicatrización de heridas.

- 5 Los datos acumulados indican que la relación de MMP a TIMP es mayor en casos de heridas que no están cicatrizando. Por ejemplo, la relación entre MMP-9 y TIMP1 es de aproximadamente 7-10 a uno para buena cicatrización y de 18-20 a uno o mayor para mala cicatrización.

10 Como se muestra en la figura 14, el análisis de la relación entre MMP y TIMP secretadas por tejidos placentarios, Apligraf y Dermagraft demostró que los productos de membrana coriónica contienen MMP y TIMP a una relación aproximada de 7, que es favorable para la cicatrización de heridas. Por el contrario, Dermagraft tenía una relación >20 y Apligraf tenía una relación >200.

Estos datos son coherentes con ciertas realizaciones de la presente invención que proporcionan un producto placentario que comprende una membrana coriónica que contiene MMP-9 y TIMP1 a una relación de aproximadamente 7-10 a uno.

15 **Ejemplo 20 α 2-Macroglobulina**

20 Se conoce la α 2-macroglobulina como una proteína plasmática que inactiva las proteinasas de las 4 clases mecanicistas. Otra función importante de esta proteína es servir como un depósito de citocinas y factores de crecimiento, cuyos ejemplos incluyen TGF, PDGF y FGF. En las heridas crónicas como las úlceras diabéticas o las úlceras venosas, la presencia de una elevada cantidad de proteasas da lugar a una rápida degradación de los factores de crecimiento y retarda la cicatrización de heridas. Por tanto, la presencia de α 2-macroglobulina en productos diseñados para la cicatrización de heridas crónicas será beneficiosa. Los resultados del análisis de matriz de proteínas mostraron que la membrana amniótica y coriónica contienen α 2-macroglobulina (tabla 13).

Estos datos son coherentes con ciertas realizaciones de la presente invención que proporcionan un producto placentario que comprende una membrana coriónica que contiene α 2-macroglobulina.

25 **Tabla 13 Expresión de α 2-macroglobulina en extractos proteínicos de tejido placentario.**

Muestra	α 2-macroglobulina (pg/ml/cm ²)
AM75	7
CM75	790
AM78	53.042
CM78	1.014

Ejemplo 21 Establecimiento de bFGF como marcador para la potencia de tejido coriónico

30 El bFGF modula una diversidad de procesos celulares, incluyendo la angiogénesis, la reparación de tejidos y la cicatrización de heridas (Presta et al., 2005, Reuss et al., 2003 y Su et al., 2008). En los modelos de cicatrización de heridas, se ha demostrado que el bFGF aumenta el cierre de la herida y potencia la formación de vasos en el sitio de la herida (Greenhalgh et al., 1990). La evaluación de las proteínas derivadas de membranas coriónicas conforme al proceso de fabricación descrito en la presente reveló que bFGF es uno de los factores principales en extractos proteínicos de tejido placentario (figura 15). La figura 15 representa la expresión de bFGF por membranas amnióticas (AM) y membranas coriónicas (CM) detectada durante la evaluación del perfil de proteínas de membranas placentarias.

35 La importancia de bFGF para la cicatrización de heridas respalda la selección de bFGF como un marcador de potencia para la evaluación de productos de membrana coriónica fabricados para uso clínico conforme a la presente descripción. Se seleccionó un kit de ELISA disponible en el mercado de R&D Systems para la evaluación de su idoneidad para medir el bFGF secretado por membranas placentarias. Los experimentos de cuantificación por el método ELISA se diseñaron de acuerdo con las directrices de la FDA e ICH para la validación de ensayos bioanalíticos (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 1994; ICH Harmonized Tripartite Guideline and Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001).

40 El procedimiento ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (catálogo de ELISA de bFGF). La evaluación del kit se realizó antes de la medición de bFGF en muestras de tejido placentario. El rendimiento del ensayo se evaluó analizando la linealidad, el intervalo, los límites inferior y superior de la cuantificación (LLOQ y ULOQ), la precisión y la exactitud. Los datos experimentales sugirieron que el intervalo de cuantificación de este

5 ensayo fue de 40-1280 pg/ml de bFGF. Los CV dentro del ensayo y entre ensayos variaron de un 2,42 a un 6,23 % y de un 0,59 a un 7,02 %, respectivamente. Además, el análisis de recuperación de muestras demostró una exactitud dentro de un 20 %. Este ensayo mostró linealidad de dilución y especificidad. La robustez se demostró por la insensibilidad del ensayo a variaciones introducidas por diferentes analistas. El rendimiento analítico del ELISA de bFGF indicó que este ensayo era adecuado para la medición de bFGF secretado por membranas placentarias. Los parámetros de ELISA de bFGF se resumen en la tabla 14.

Tabla 14 Parámetros de ELISA establecidos para medir bFGF en homogeneizados de placenta.

Intervalo del patrón de calibrado	20-1280 pg/ml
Intervalo de cuantificación del ensayo	40-1280 pg/ml
LLOQ	40 pg/ml
LOD	20 pg/ml
ULOQ	1280 pg/ml

Expresión de bFGF en membranas coriónicas

10 La medición de bFGF en preparaciones de membrana coriónica ha demostrado ser tanto fiable como reproducible. Los homogeneizados de tejido placentario se prepararon usando el método de "microesferas" como se ha describe anteriormente. Además, se evaluó la secreción de bFGF en medio de cultivo tisular. La medición de bFGF en múltiples donantes demostró que este método de cuantificación era un medio valioso de evaluación de la potencia de los productos tisulares descritos en la presente preparados para su uso en un entorno clínico. La figura 16 muestra la expresión representativa de bFGF en muestras de tejido coriónico derivadas de dos donantes diferentes de placenta. Los resultados se han reproducido en múltiples preparaciones tisulares.

Estos datos son coherentes con ciertas realizaciones de la presente invención que proporcionan un producto placentario que comprende una membrana coriónica que contiene bFGF.

Ejemplo 22 Los tejidos placentarios potencian la migración celular y la cicatrización de heridas

20 El proceso de cicatrización de heridas es muy complejo e implica una serie de eventos estructurados controlados por los factores de crecimiento (Goldman, 2004). Estos eventos incluyen aumento de la vascularización, infiltración por células inmunitarias inflamatorias y aumentos en la proliferación celular. Las fases iniciales de la cicatrización de heridas giran en torno a la capacidad de las células individuales de concentrarse en la herida y migrar a la zona herida para cerrar la zona de la herida y reconstruir el tejido adyacente. Tras la estimulación apropiada, varios tipos diferentes de células, incluyendo células epiteliales, endoteliales, mesenquimatosas y fibroblásticas quedan implicadas en el proceso de cicatrización de heridas (Pastar et al., 2008 y Bannasch et al., 2000). Específicamente, proliferan y migran en la zona de la herida para promover la cicatrización. Por lo tanto, se realizaron experimentos para determinar si los factores secretados desde membrana amniótica y coriónica producidas conforme a la presente descripción promueven la migración de vrl1 y el cierre de la zona de herida. Para conseguir esto, se utilizó un ensayo de cicatrización de heridas disponible en el mercado (Cell Biolabs) y una línea de células endoteliales microvasculares humanas muy aceptada (HMVEC, Lonza Inc.). Los resultados indicaron que la migración celular se potenciaba por tratamiento con medios acondicionados de las membranas placentarias.

Migración celular *in vitro*

35 Se cultivaron células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC) en condiciones normales de cultivo celular en medio completo definido (Lonza Inc.). Para evaluar la migración y el cierre de la zona de herida, se usó un ensayo de cicatrización de heridas disponible en el mercado (Cell Biolab). El principio del ensayo se resume en la figura 17.

La figura 17 representa el ensayo de cicatrización de heridas Cytoselect de 24 pocillos de Cell Biolabs. (Figura reproducida de Cell Biolabs).

40 Se recogieron células por tratamiento con tripsina, se sedimentaron y se contaron antes de resuspenderlas en medio completo a una densidad de 2×10^5 células/ml. Después se pipetearon 250 μ l (5×10^4 células) de suspensión celular en cada lado de un pocillo que contiene un inserto de cicatrización de heridas (placa de ensayo de cicatrización de heridas Cytoselect de 24 pocillos, Cell Biolabs). Las células se cultivaron durante 24 horas en medio completo. Después de 24 horas, se retiraron los insertos de herida. Al mismo tiempo, se retiró el medio completo y se reemplazó con medio experimental. Se usó medio completo y medio basal como control positivo y negativo, respectivamente. Para generar el medio experimental, se incubaron membranas placentarias durante 3

días en DMEM con seroalbúmina humana (HSA) al 1 % en una incubadora de cultivo tisular. El tejido y el medio resultantes entonces se colocaron en tubos Eppendorf y se centrifugaron a alta velocidad en una microcentrífuga. Los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para los estudios de migración y cicatrización de heridas, el medio acondicionado de las membranas placentarias se diluyó 1:20 en medio basal antes de añadirse a los pocillos experimentales. Después de 18 horas, se retiró el medio y las células se fijaron durante 20 min en un 4 % de paraformaldehído y se tiñeron con violeta cristal. Entonces se fotografió la zona de herida en cada pocillo. La cicatrización de heridas se determinó por la cantidad de zona de herida aún visible al final del experimento en comparación con las imágenes de control tomadas antes de añadir el medio acondicionado a los pocillos.

10 El medio acondicionado de membrana placentaria mantiene la migración celular y el cierre de la zona de herida

El medio acondicionado de membranas amnióticas y coriónicas se usó para evaluar el potenciar de estas membranas de promover la migración celular y el cierre de la zona de herida. El medio acondicionado de membranas coriónicas placentarias mantenía la migración de células en la zona de herida experimental. La figura 18 representa las imágenes representativas de HMVEC tratadas con un 5 % de medio acondicionado de tejido amniótico, coriónico o una combinación de tejido amniótico/coriónico, así como controles positivos y negativos. La zona de herida es de 0,9 mm de anchura.

La capacidad de los factores de las membranas placentarias producidas conforme a la presente descripción de promover la migración de HMVEC indicó que estos tejidos tienen la capacidad de potenciar la cicatrización de heridas. Además, basándose en las ideas de los autores de la invención, se ha descubierto sorprendentemente que estos tejidos también potencian la revascularización, ya que la línea celular HMVEC deriva de células de endotelio vascular.

Estos datos demuestran que los productos placentarios de la presente invención producen niveles inesperadamente superiores de factores que promueven los tratamientos de cicatrización de heridas.

Ejemplo 23 Análisis de factores en productos ejemplares de tejido placentario

25 La tabla 15 representa el perfil bioquímico de productos placentarios ejemplares de la invención (resultados ajustados por cm^2 después de sustraer el fondo negativo).

Tabla 15 Factores en producto de tejido placentario (pg/cm^2)

	Unidades	Apligraf	Dermagraft	AM75	CM75	AM78	CM78
hMMP1	$\text{pg}/\text{ml}/\text{cm}^2$	1.964.945,37	14.818,20	2.821,85	3531,81	117.326,89	95,46
hMMP7	$\text{pg}/\text{ml}/\text{cm}^2$	911,54	0,00	0,00	0,00	3,96	0,00
hMMP10	$\text{pg}/\text{ml}/\text{cm}^2$	0,00	0,00	113,94	0,00	0,00	0,00
hMMP13	$\text{pg}/\text{ml}/\text{cm}^2$	21,61	0,00	0,00	0,00	0,71	0,00
hMMP3	$\text{pg}/\text{ml}/\text{cm}^2$	208.281,70	180.721,52	170,26	161,52	8.325,17	0,00
hMMP9	$\text{pg}/\text{ml}/\text{cm}^2$	8.872,28	19.321,39	214,78	1.455,11	630,56	57,59
hMMP2	$\text{pg}/\text{ml}/\text{cm}^2$	153.341,77	19.712,21	287,14	37,93	3.823,38	24,44
hMMP8	$\text{pg}/\text{ml}/\text{cm}^2$	36,92	12,19	0,00	0,00	0,00	0,00
hTIMP1	$\text{pg}/\text{ml}/\text{cm}^2$	2.487,18	10.909,84	569,23	883,05	28.743,48	97,94
hTIMP2	$\text{pg}/\text{ml}/\text{cm}^2$	7.285,53	1.796,56	89,29	13,72	424,06	4,83
MMP/TIMP		239,26	19,72	6,81	6,26	4,50	2,62

30 **Ejemplo 24 Factores en productos placentarios ejemplares medidos a través de análisis de matriz de proteínas por Aushon Biosystems**

La tabla 16 representa el perfil bioquímico de los lisados de productos placentarios ejemplares de la invención (resultados ajustados por cm^2 después de sustraer el fondo negativo).

Tabla 16

	Lisado AM75	Lisado AM78	Lisado CM75	Lisado CM78
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
hACRP30	50,8	1154,6	1213,7	225,3
hAlfa2-Macroglobulina	1.910,6	426.191,6	8.174,4	9.968,6
hEGF	127,3	361,4	0,0	0,8
hbFGF	119,1	821,5	375,0	351,3
hGCSF	0,7	3,2	1,2	0,7
hHBEGF	127,5	168,0	15,4	84,5
hHGF	3.943,7	15.060,0	29.979,6	50.392,8
hIGFBP1	5.065,0	9.456,6	934,0	1.443,6
hIGFBP2	12-460,8	5.569,7	135,9	134,6
hIGFBP3	50.115,7	41.551,4	4.571,5	11.970,2
hIL1ra	3881,0	32.296,9	5.168,2	525,5
hKGF	1,4	8,8	3,1	1,5
hLIF	0,0	4,2	0,0	0,0
hMMP1	9.144,1	20.641,2	2.882,9	6.582,3
hMMP10	0,0	15,5	79,3	87,5
hMMP2	2.067,3	4.061,9	949,5	748,8
hMMP3	0,0	36,2	0,0	0,0
hMMP7	5,1	11,4	4,5	9,1
hMMP8	0,0	0,0	0,0	0,0
hMMP9	92,2	2.878,1	2.676,2	1.259,3
hNGAL	6.900,1	6.175,9	938,5	229,7
hPDGFAA	0,0	12,5	39,8	35,2
hPDGFAB	11,2	31,3	14,4	14,0
hPDGFbb	4,6	13,4	4,0	1,3
hPEDF	0,0	652,6	0,0	0,0
hTIMP1	7.958,1	35.955,6	50.712,3	17.419,9
hTIMP2	3.821,8	7.443,2	640,7	780,0
hVEGF	3,3	11,8	125,2	8,4
hVEGFC	46,5	150,0	123,5	51,7
hVEGFD	25,7	31,0	15,0	20,4

1

REIVINDICACIONES

1. Un producto placentario que comprende: un medio de criopreservación y una membrana coriónica, en donde:
 - a. la membrana coriónica está sustancialmente libre de células del trofoblasto, macrófagos CD14+ o tanto células del trofoblasto como macrófagos CD14+; y
 - 5 b. en donde el medio de criopreservación comprende una cantidad criopreservante de un criopreservante; y
 - c. en donde la membrana coriónica comprende células terapéuticas viables, en donde las células terapéuticas viables son originarias de la membrana coriónica y son una o más de
 - i. células madre mesenquimatosas ("MSC");
 - ii. fibroblastos; y
 - 10 iii. células estromales.
2. El producto placentario de la reivindicación 1, en donde el criopreservante comprende un criopreservante de penetración celular, un criopreservante sin penetración celular o una combinación de los mismos, opcionalmente en donde el criopreservante comprende un criopreservante de penetración celular que comprende ("DMSO") o DMSO en una cantidad mayoritaria.
- 15 3. El producto placentario de la reivindicación 2, en donde el medio de criopreservación comprende además albúmina, opcionalmente en donde la albúmina es seroalbúmina humana ("HSA").
4. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones 1- 3, en donde al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 74,3 %, al menos un 83,4 %, al menos un 90 % o al menos un 92,5 % de las células estromales son viable después de un ciclo de congelación-descongelación y,
 - 20 opcionalmente, en donde las células estromales están en una cantidad de 5.000 a 50.000 por cm² de la membrana coriónica.
5. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones 1- 4, en donde la membrana coriónica está sustancialmente libre de una o más células dendríticas maternas, leucocitos maternos o células maternas inmuno genas.
- 25 6. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones 1- 5, en donde después de un ciclo de congelación-descongelación, el producto placentario o la membrana coriónica libera entre 0 y 420 pg/ml de TNF- α en un medio de cultivo tisular tras colocar un trozo de 2 cm x 2 cm del producto placentario en un medio de cultivo tisular y exponer el producto placentario a un lipopolisacárido bacteriano durante 20 a 24 horas.
- 30 7. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones 1- 6, en donde la membrana coriónica comprende las MSC en una cantidad de al menos 1.500 células/cm², al menos 3.000 células/cm², de 1.500 a 9.000 células/cm² o de 3.000 a 9.000 células/cm².
8. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la membrana coriónica comprende una membrana basal, una capa reticular o una combinación de las mismas.
- 35 9. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la membrana coriónica tiene un grosor de 40 μ m a 400 μ m.
10. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la membrana coriónica comprende un lado materno que comprende fragmentos de proteínas de la matriz extracelular en una concentración mayor que la de un corion no procesado natural, opcionalmente en donde una parte de los fragmentos proteínicos de la matriz extracelular comprende leucina o fenilalanina terminal.
- 40 11. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la membrana coriónica comprende las MSC en una cantidad de un 5 % a un 30 %, de un 5 % a un 25 %, de un 5 % a un 20 %, de un 5 % a un 15 %, de un 3 % a un 12 %, de al menos un 5 %, de al menos un 10 % o de al menos un 15 %, respecto a la cantidad total de células en la membrana coriónica, opcionalmente en donde al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 % o al menos un 70 % de las MSC son viables después de un ciclo de congelación-descongelación.
 - 45
12. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además una membrana amniótica y, opcionalmente, en donde la membrana amniótica comprende una capa de células epiteliales amnióticas y en donde la membrana amniótica y la membrana coriónica están asociadas entre sí en la arquitectura natural.
- 50 13. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la membrana coriónica está

sustancialmente libre de tejido vascularizado o células inmunógenas derivadas de tejido vascularizado.

14. El producto placentario de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de una herida.

15. El producto placentario para el uso de la reivindicación 14, en donde la herida es una úlcera.

5 16. El producto placentario de la reivindicación 6, en donde al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 % o al menos un 70 % de las MSC son viables después del ciclo de congelación-descongelación.

FIGURA 1A
Congelación - Caja de Styrofoam frente a balda de congelador

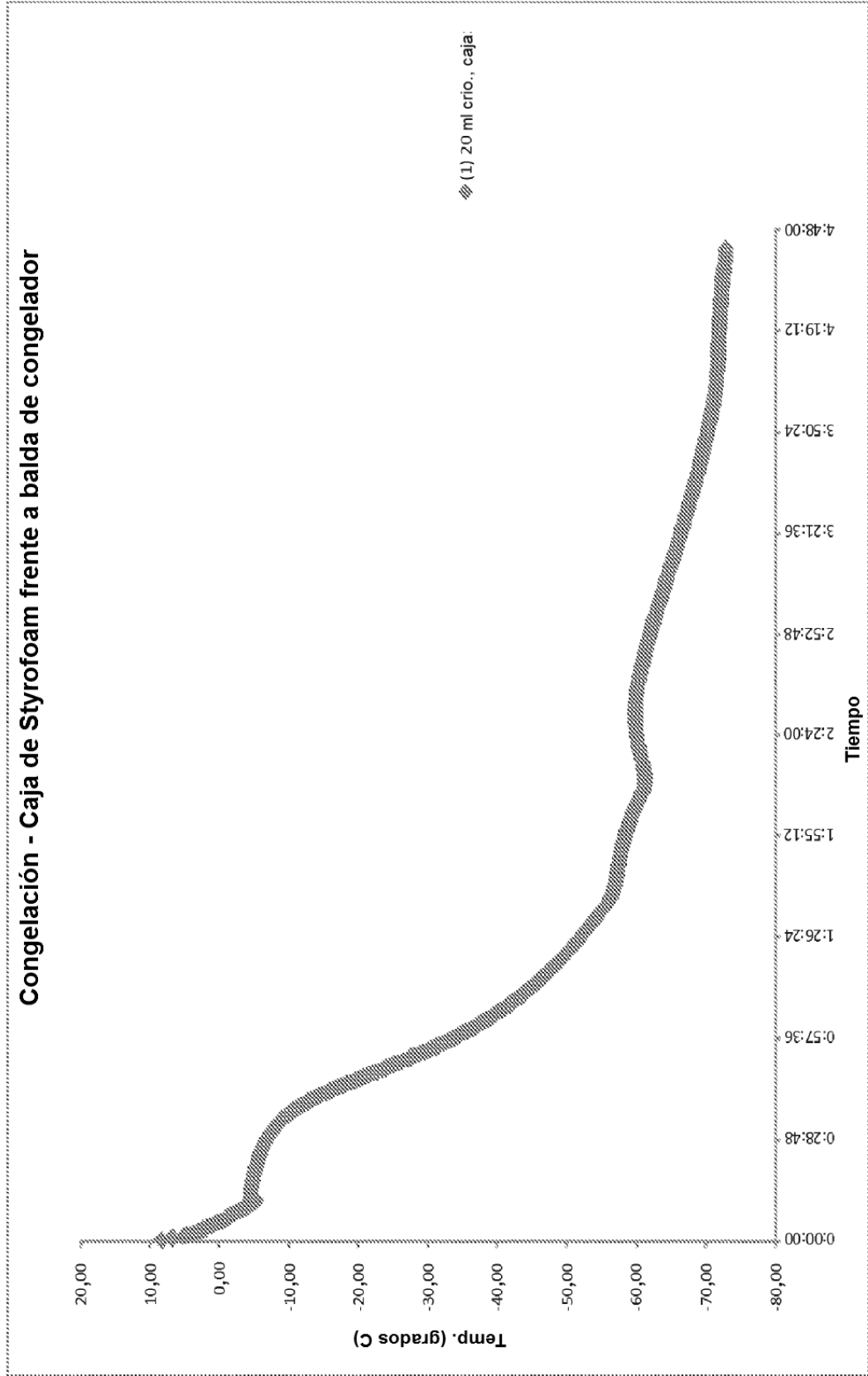


FIGURA 1B

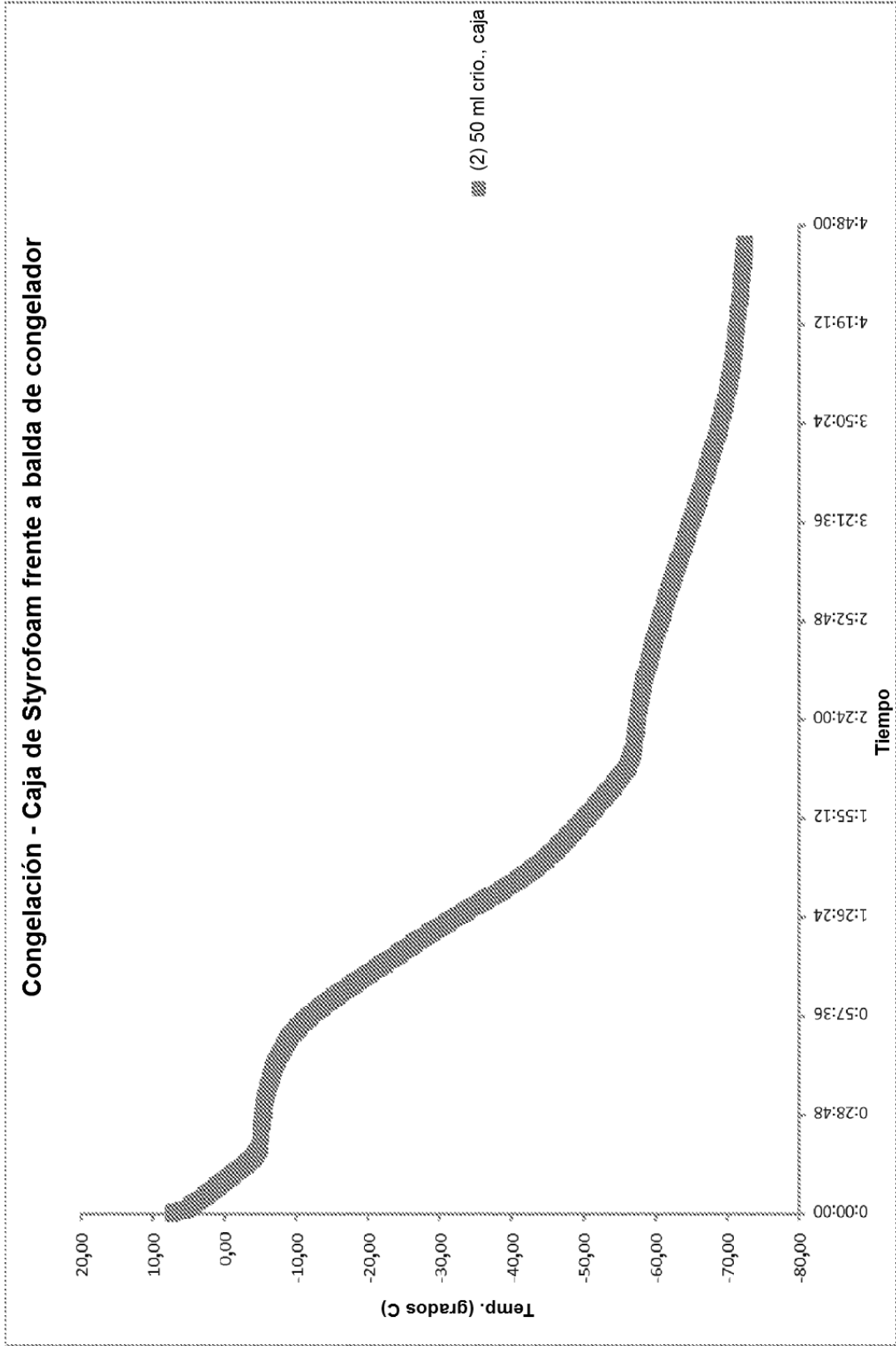


FIGURA 1C
Congelación - Caja de Styrofoam frente a balda de congelador

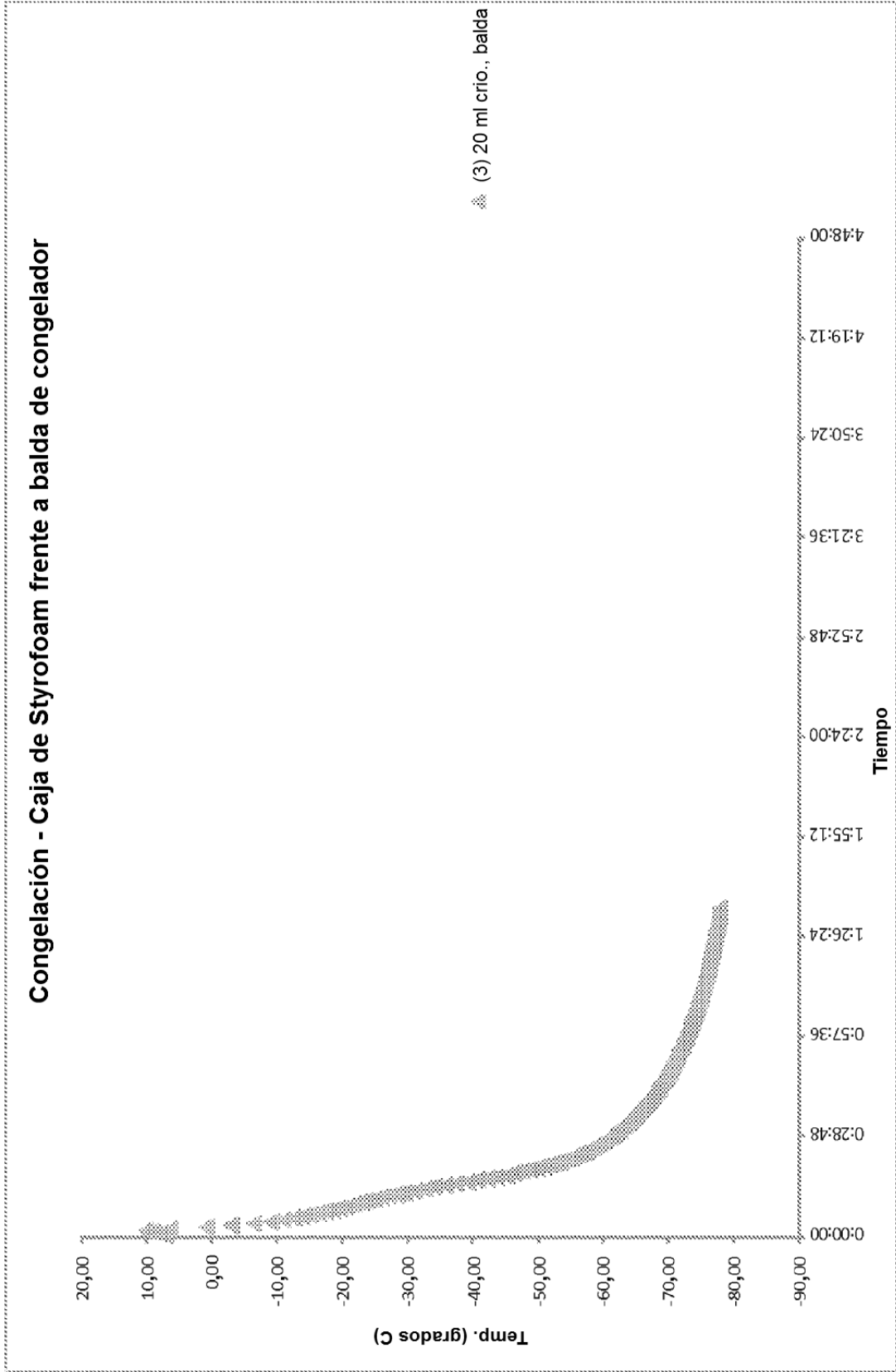


FIGURA 1D
Congelación - Caja de Styrofoam frente a balda de congelador

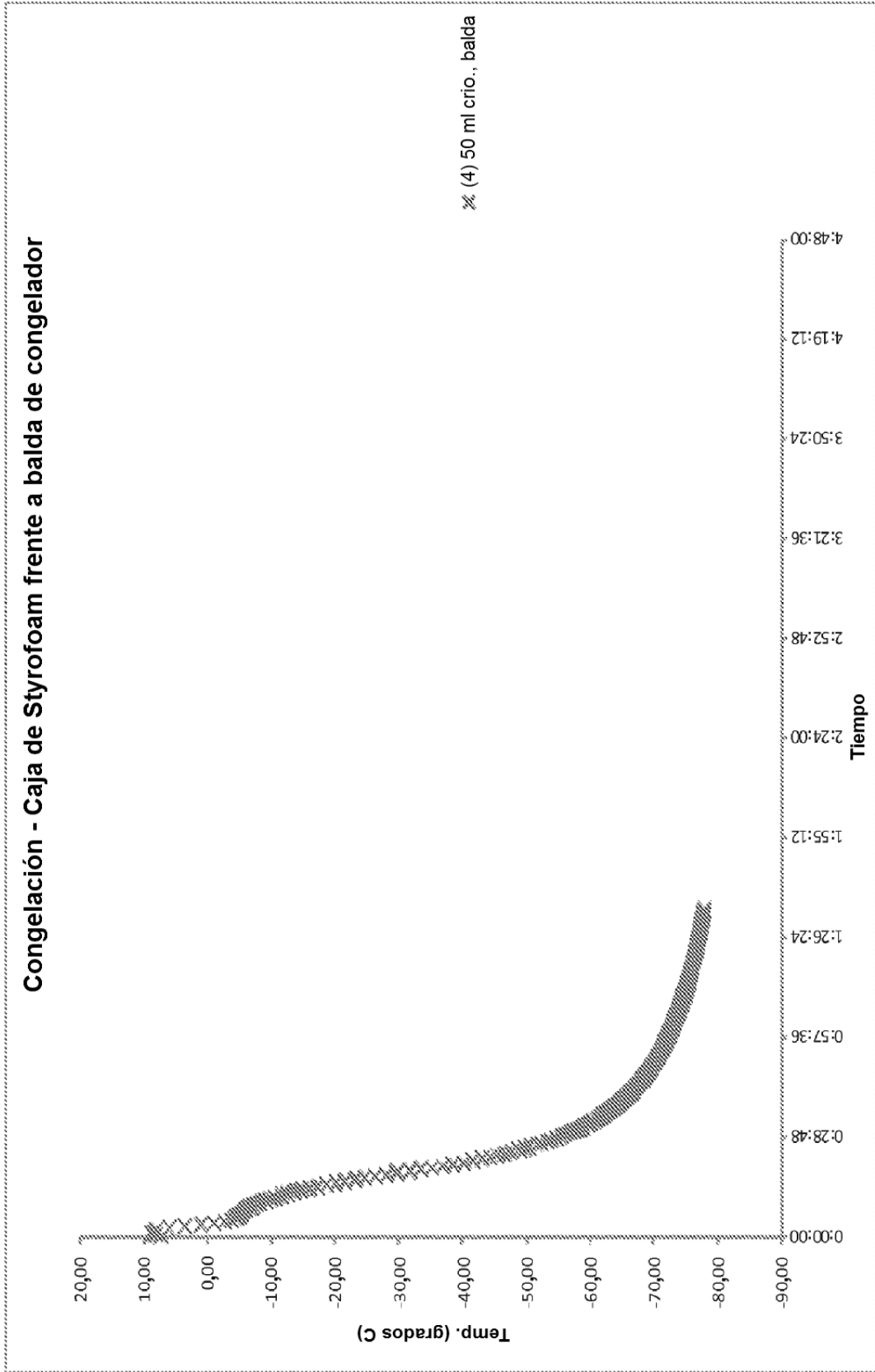


FIGURA 1E

Congelación - Caja de Styrofoam frente a balda de congelador

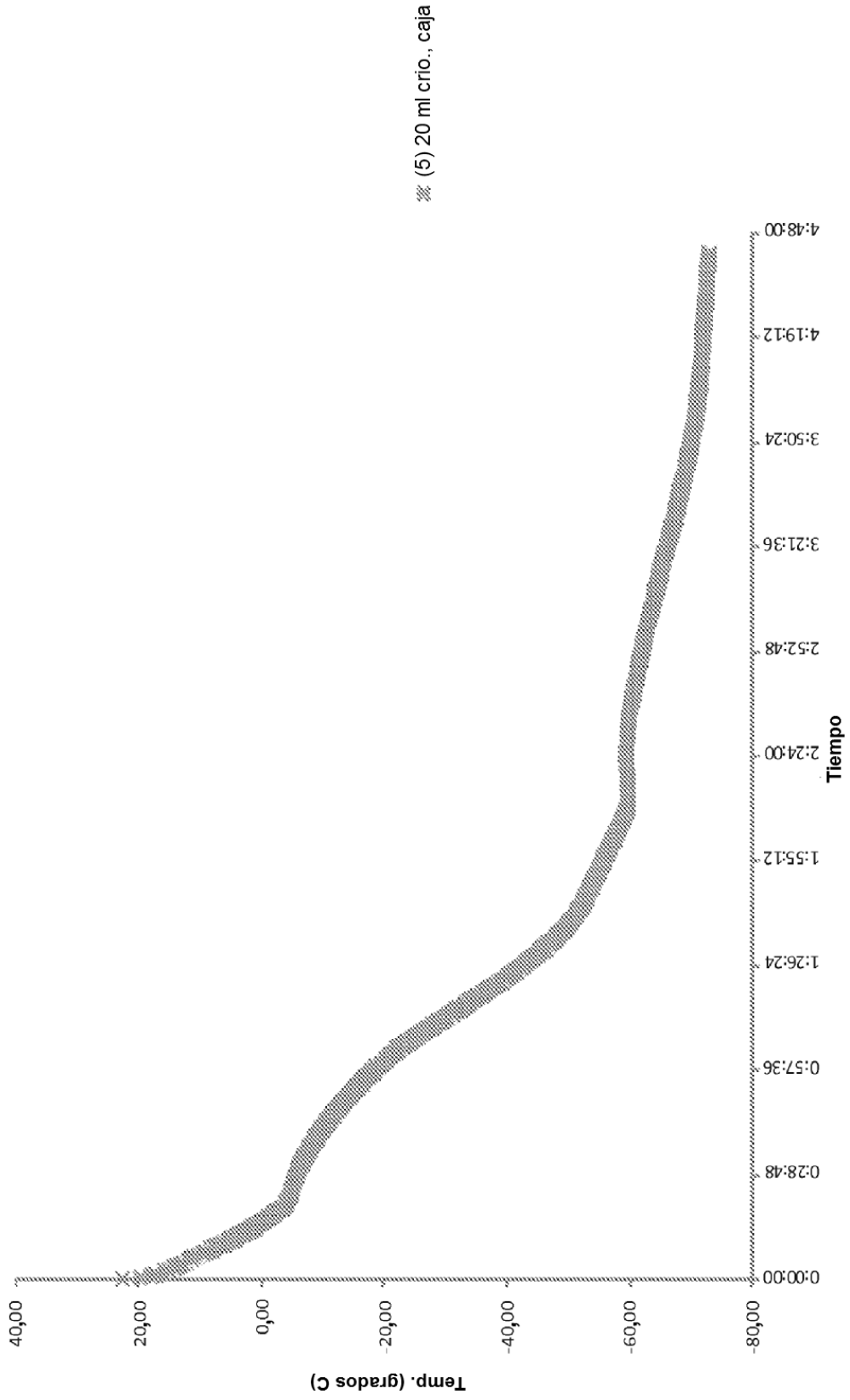


FIGURA 1F

Congelación - Caja de Styrofoam frente a balda de congelador

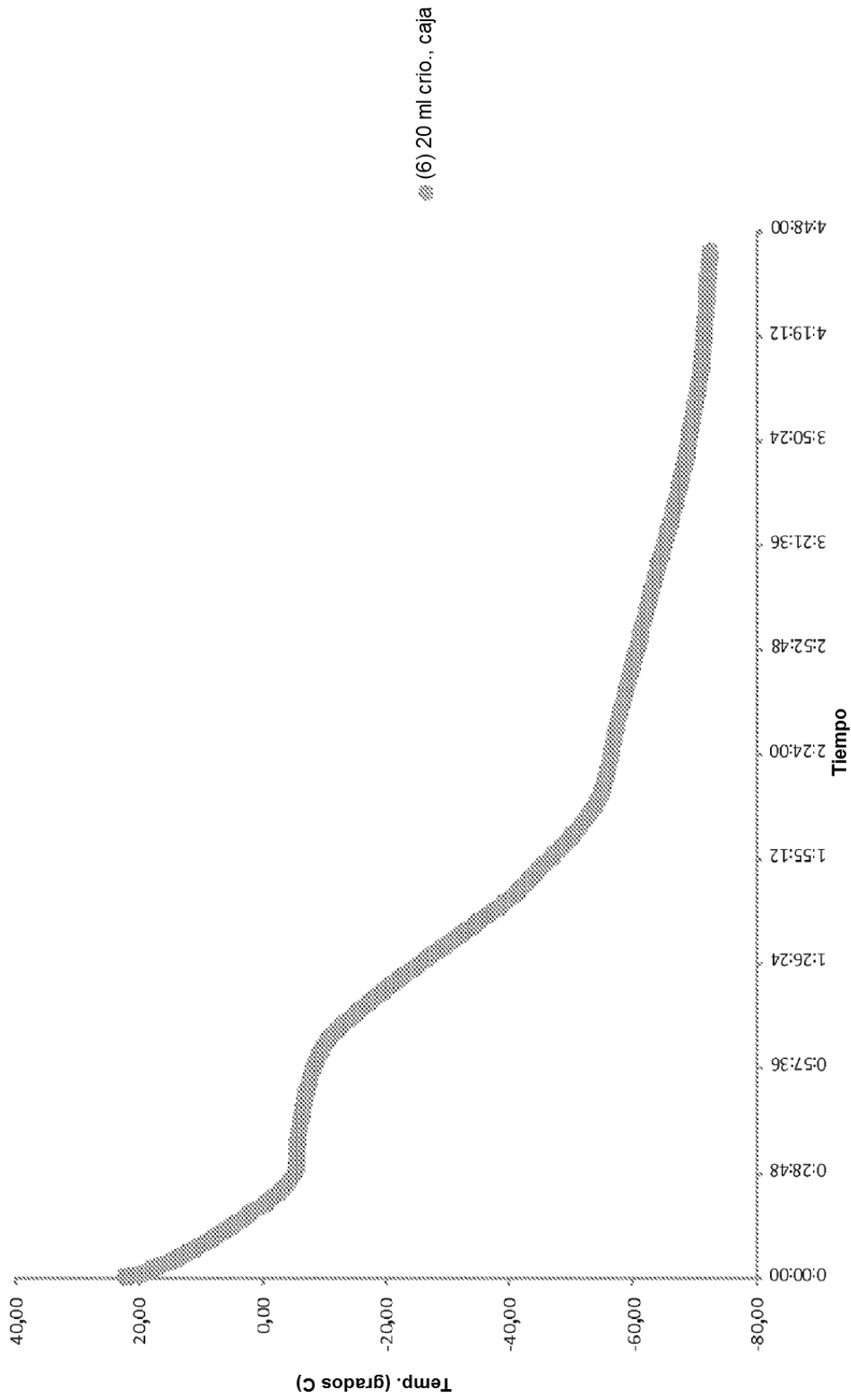


FIGURA 1G

Congelación - Caja de Styrofoam frente a balda de congelador

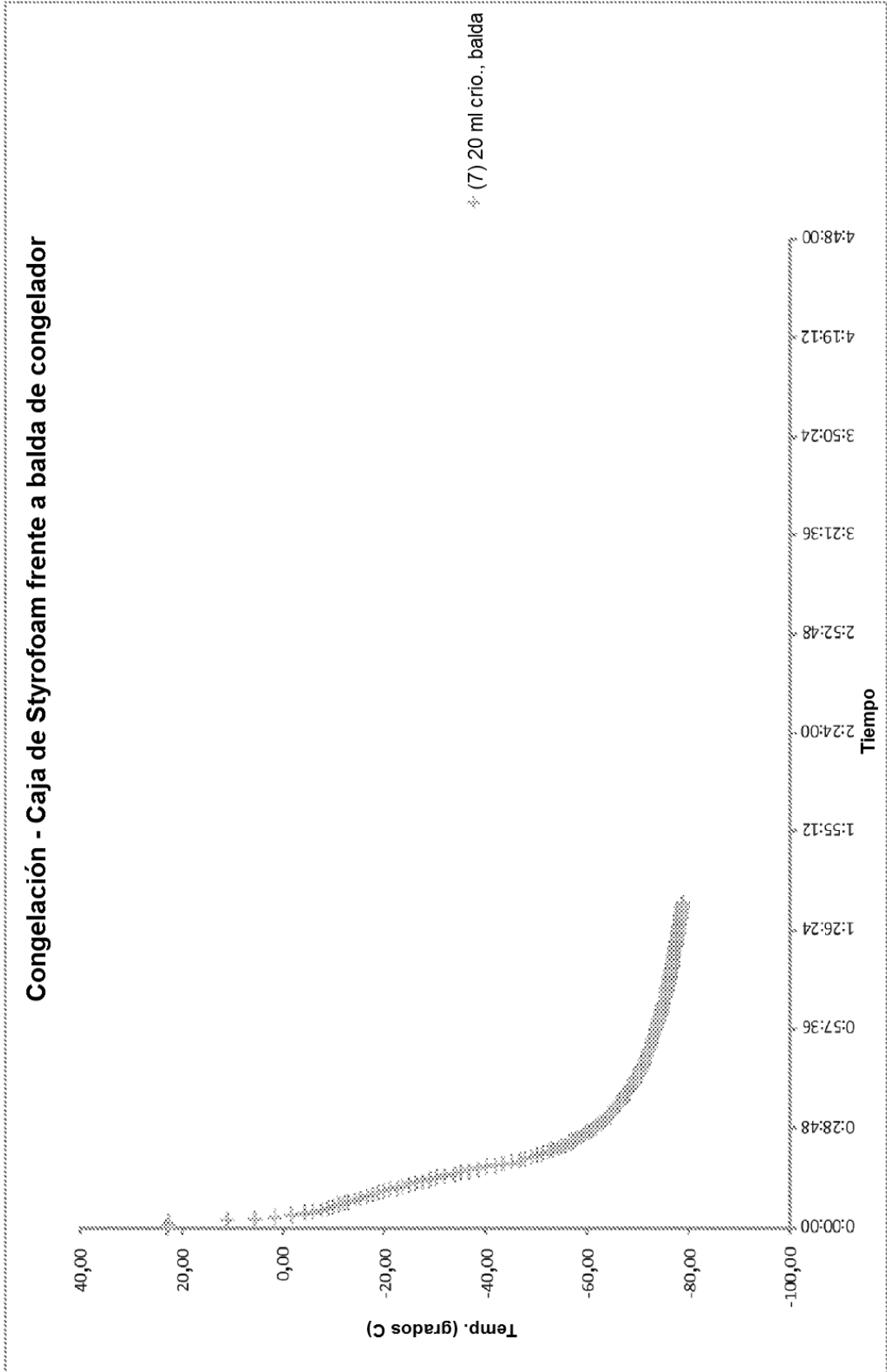


FIGURA 1H
Congelación - Caja de Styrofoam frente a balda de congelador

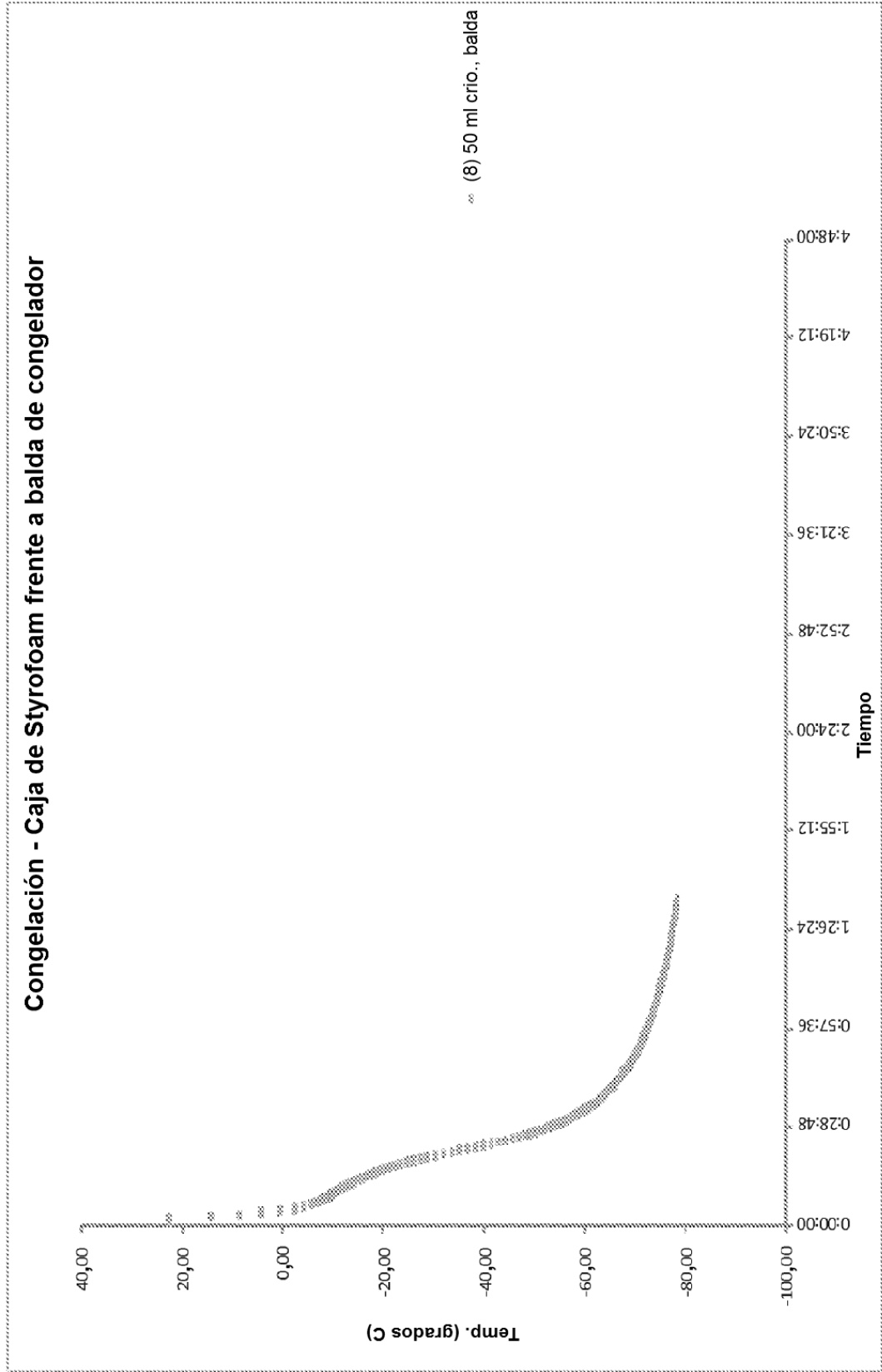


FIGURA 2

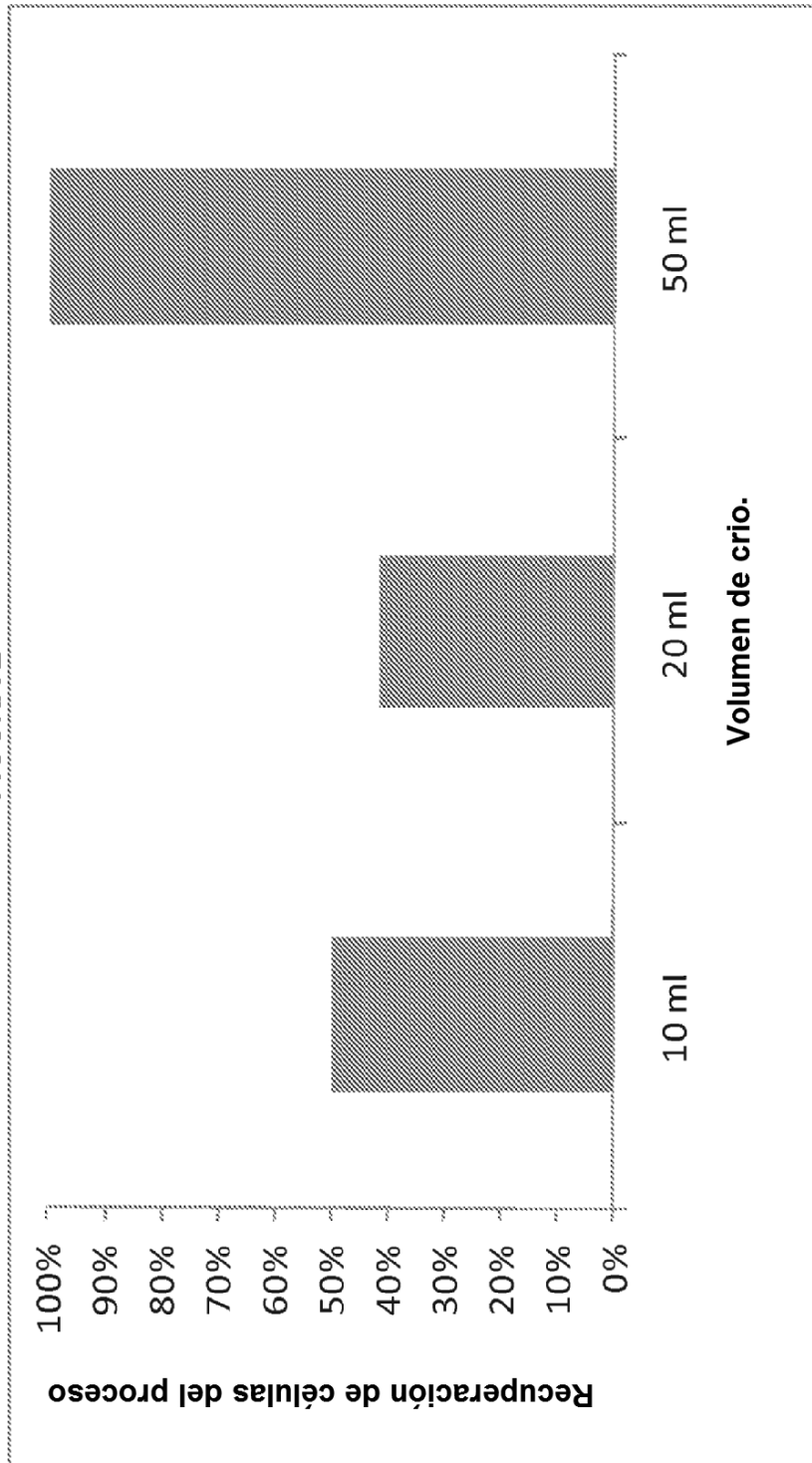


FIGURA 3

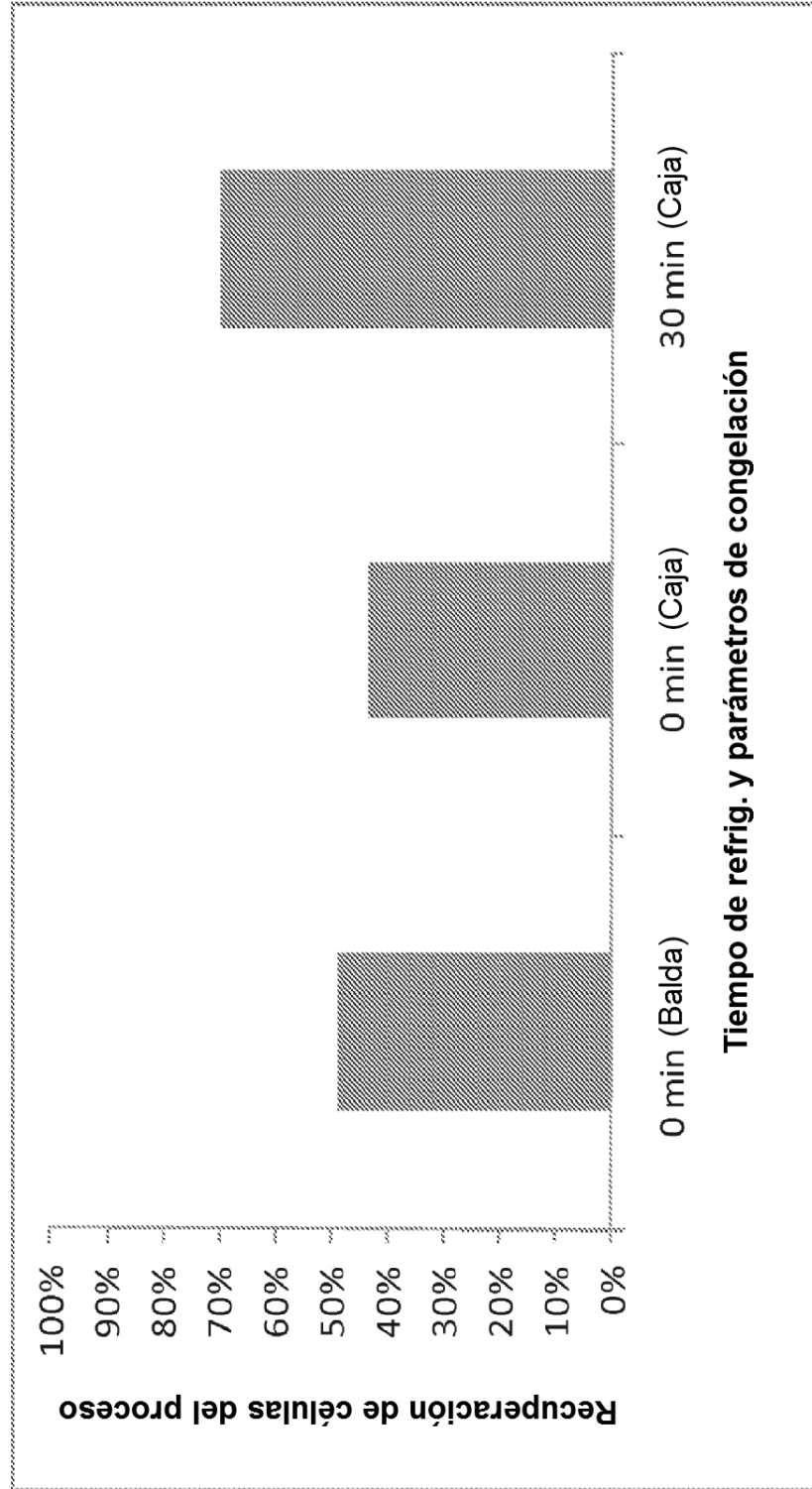


FIGURA 4

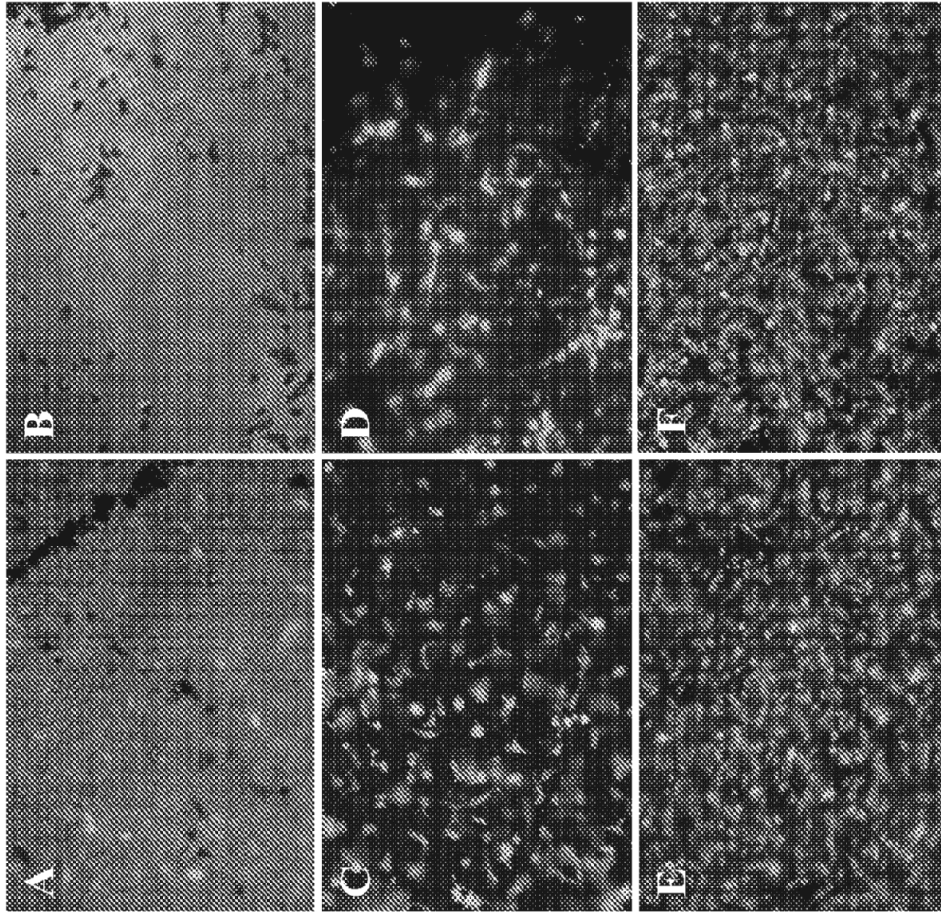


FIGURA 5
Expresión de IL-2R en linfocitos T estimulados por células derivadas de placenta
(37 donantes frescos)

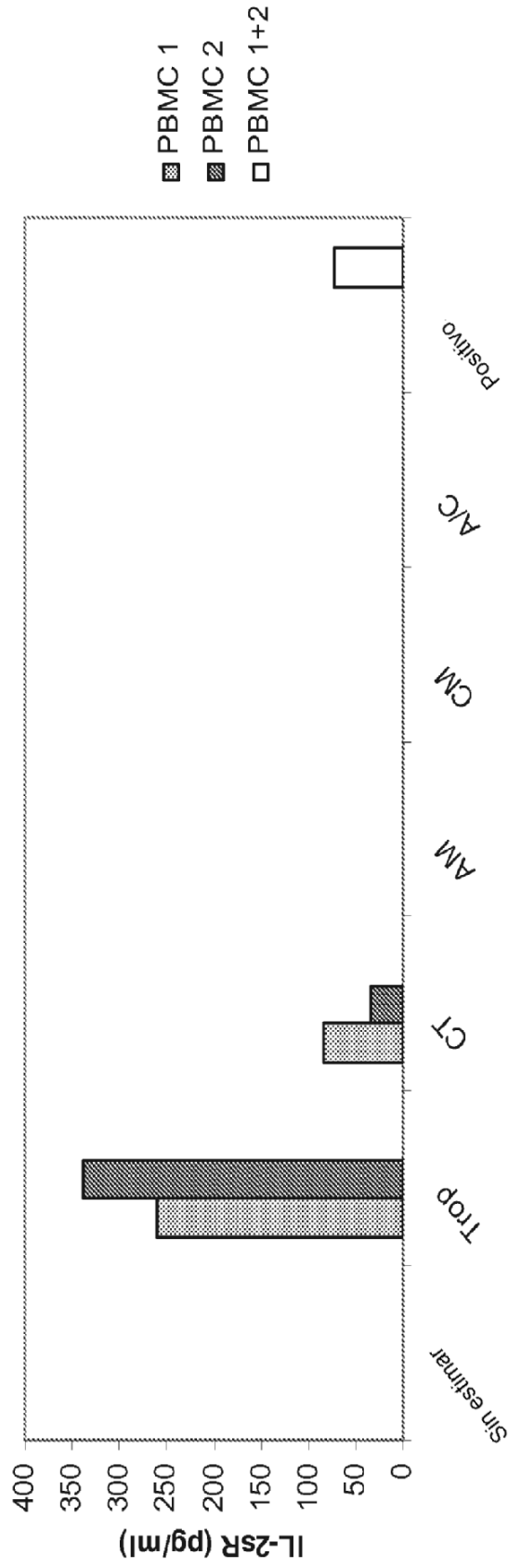


FIGURA 6

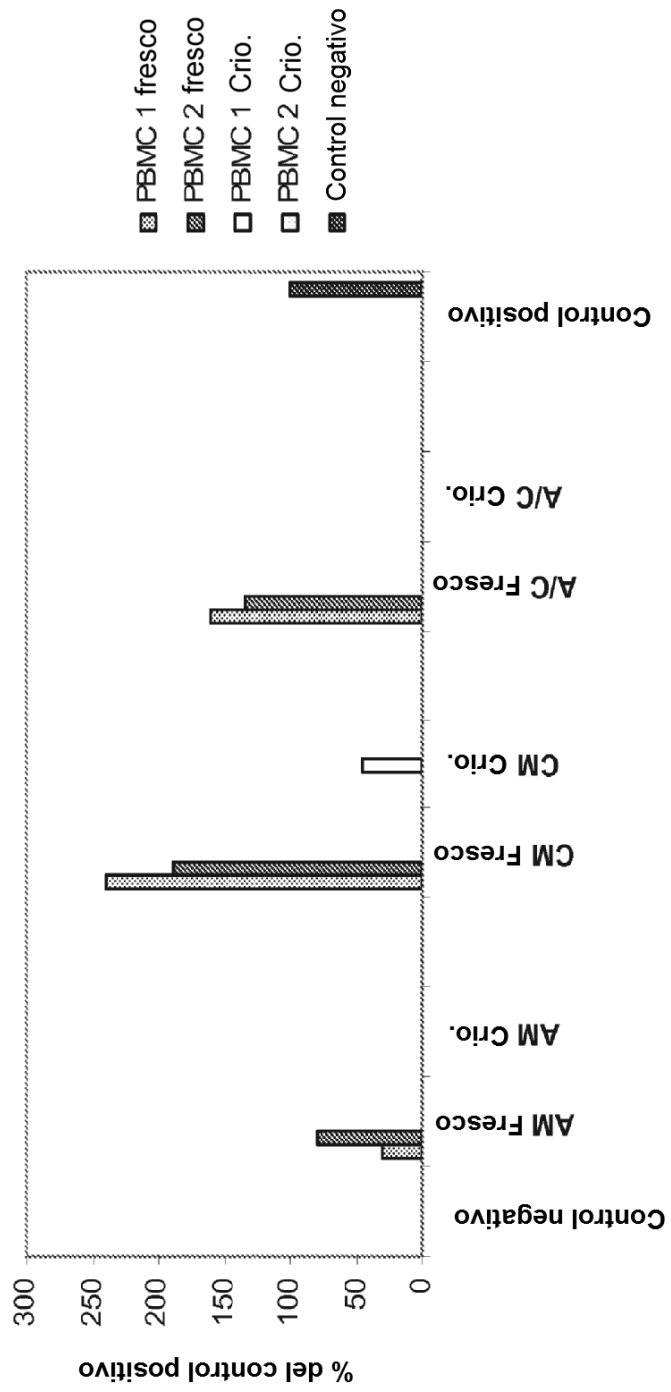


FIGURA 7A

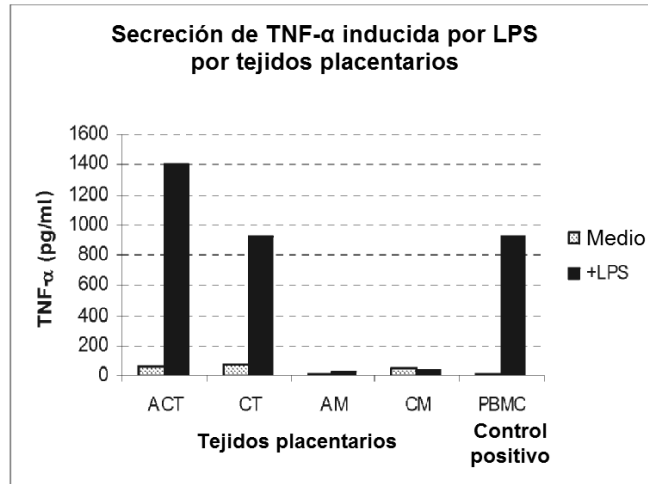


FIGURA 7B

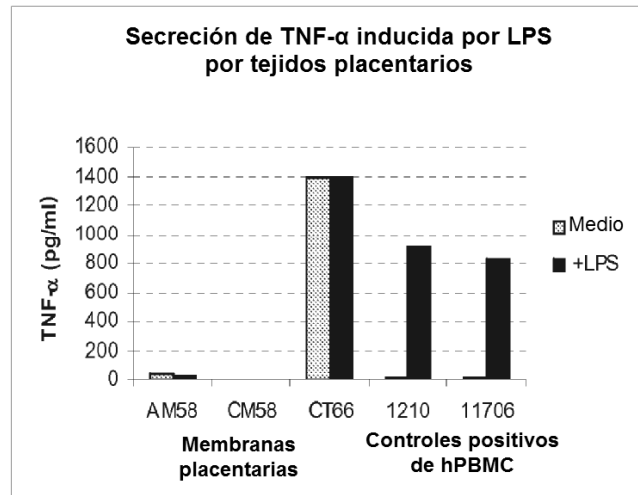


FIGURA 7C

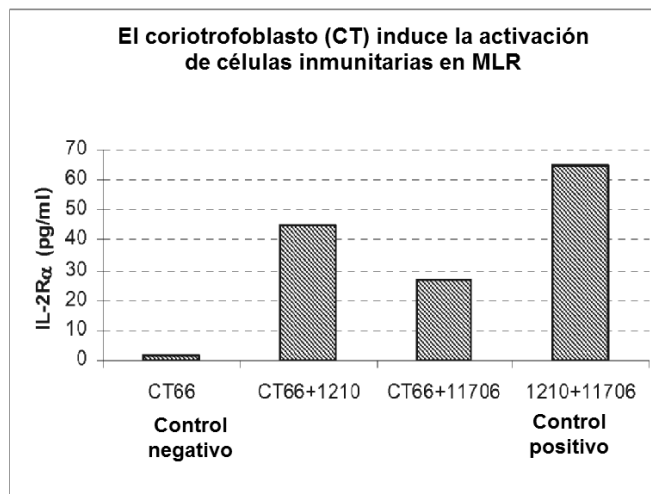


FIGURA 8A

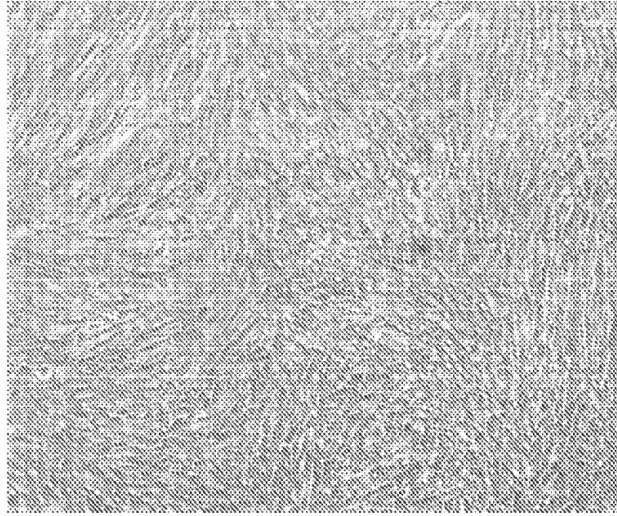


FIGURA 8B

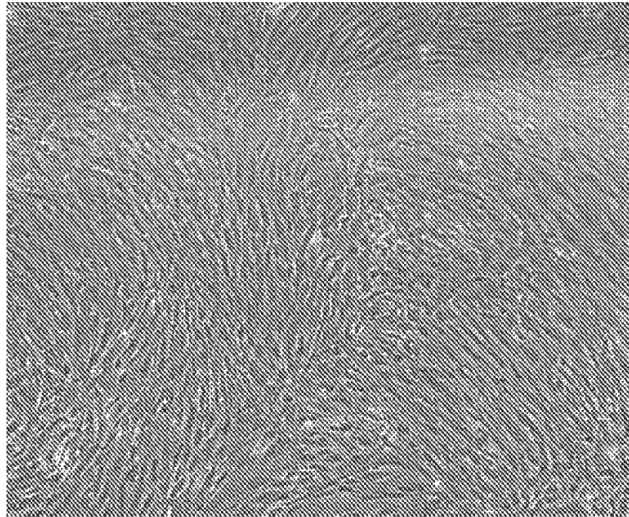
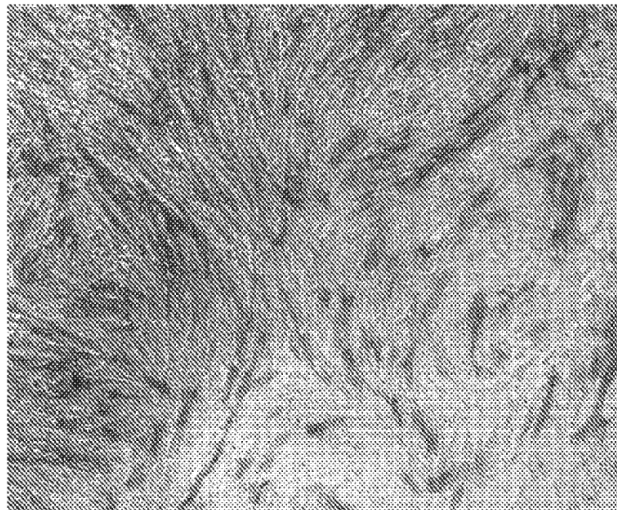


FIGURA 8C



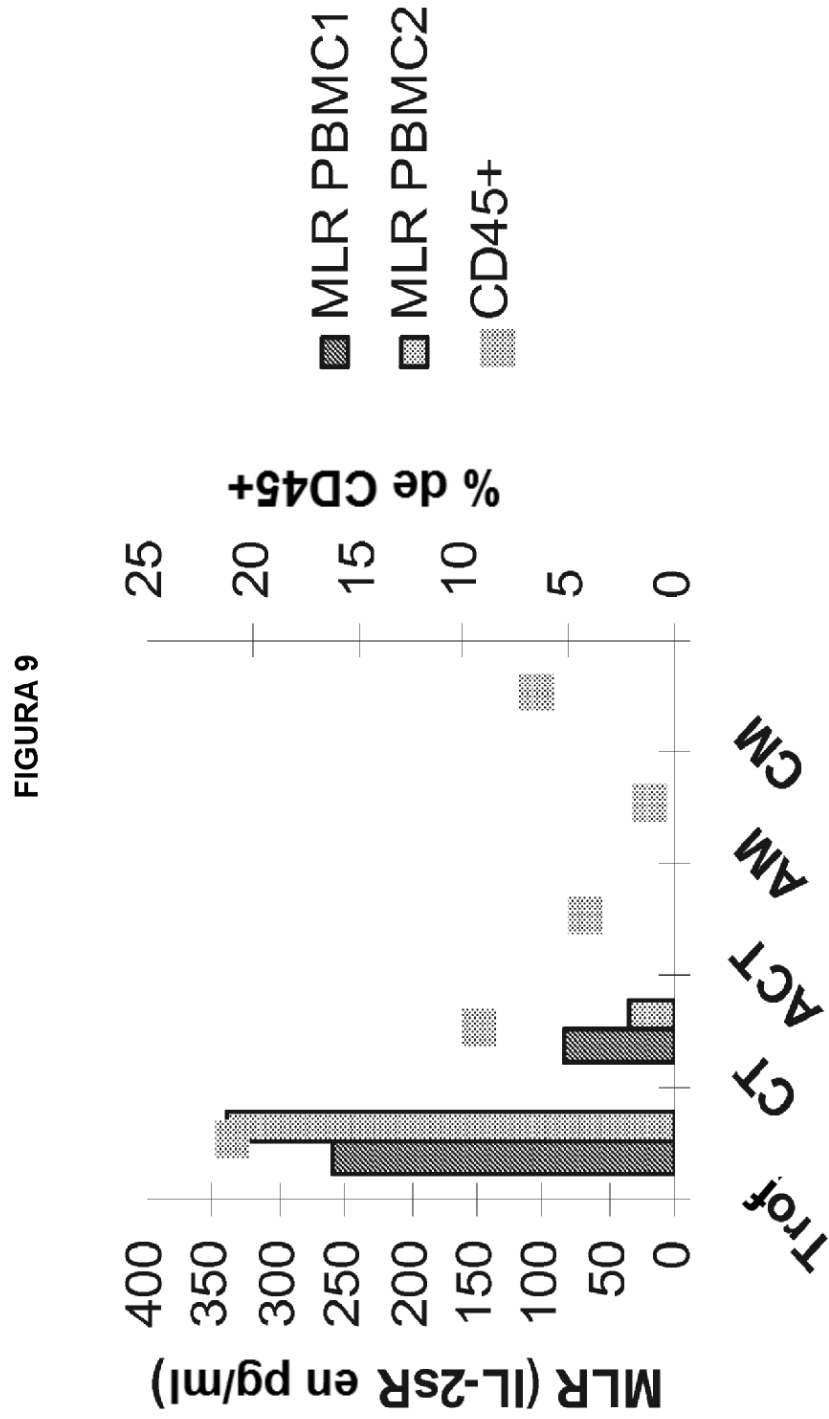


FIGURA 10

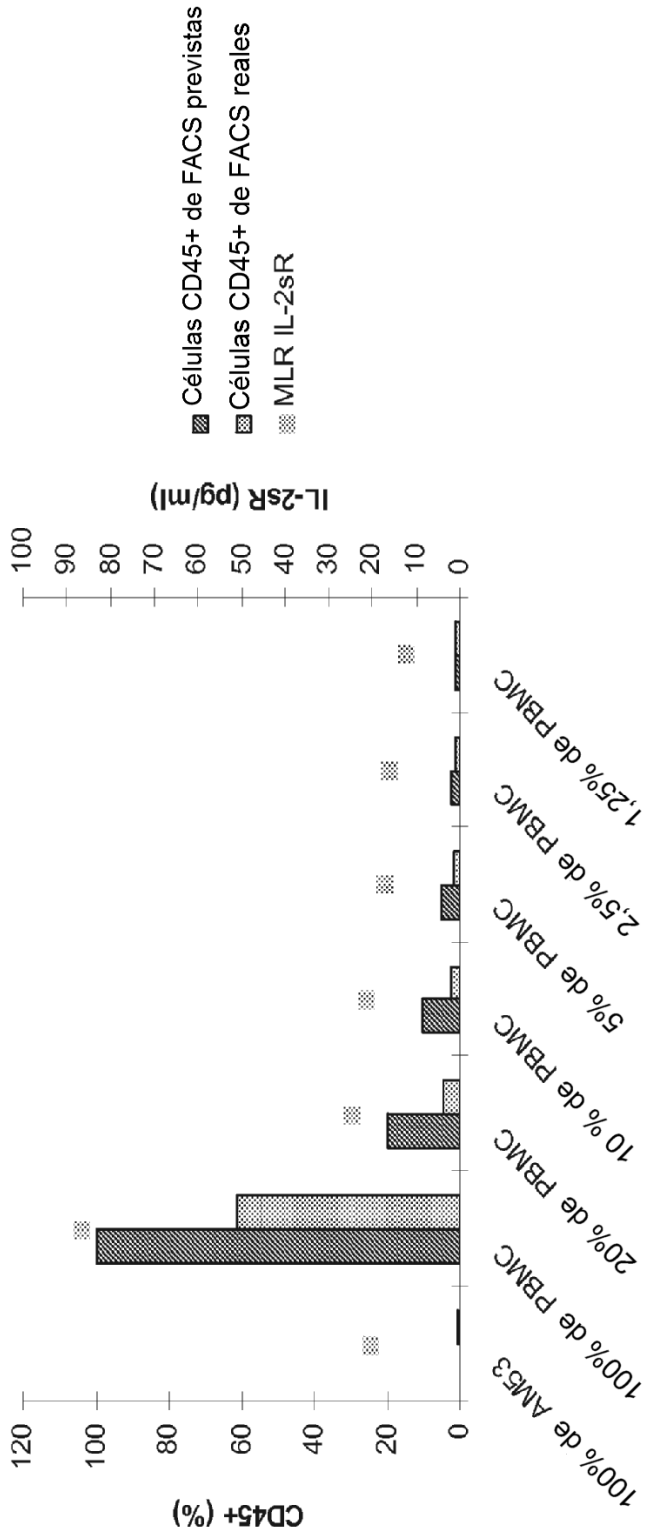


FIGURA 11A

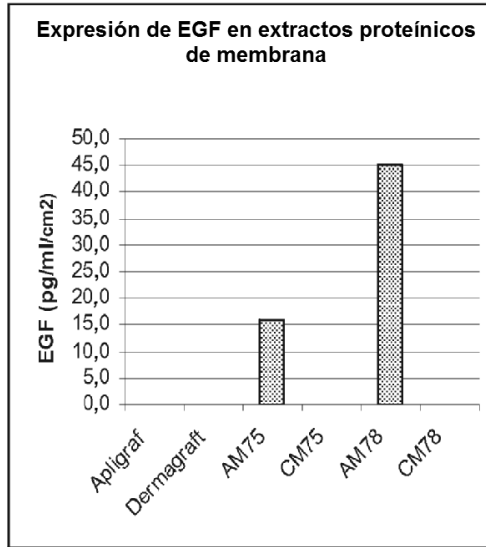


FIGURA 11B

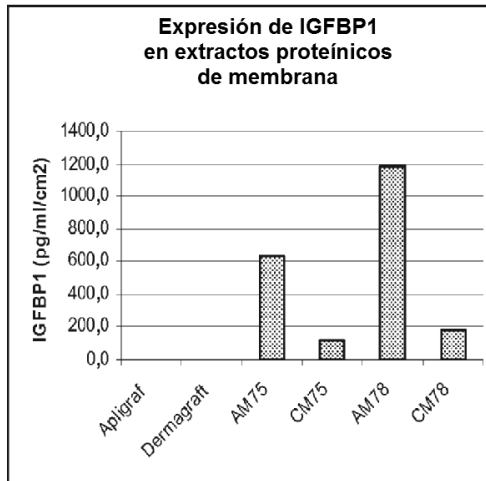


FIGURA 11C

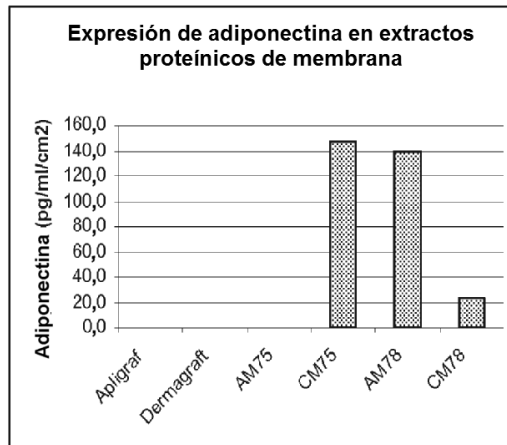


FIGURA 12A

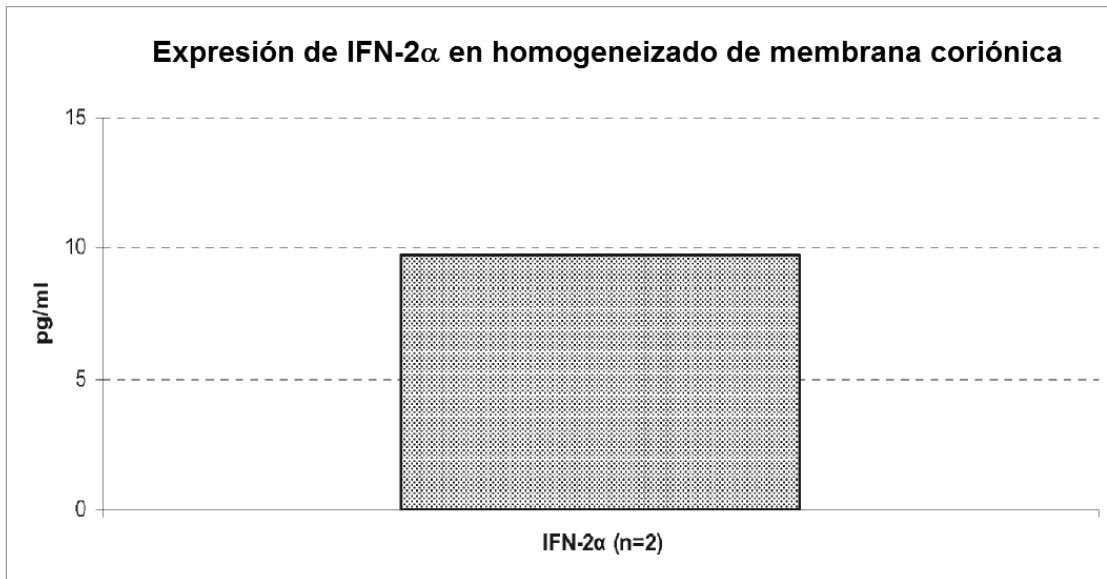


FIGURA 12B

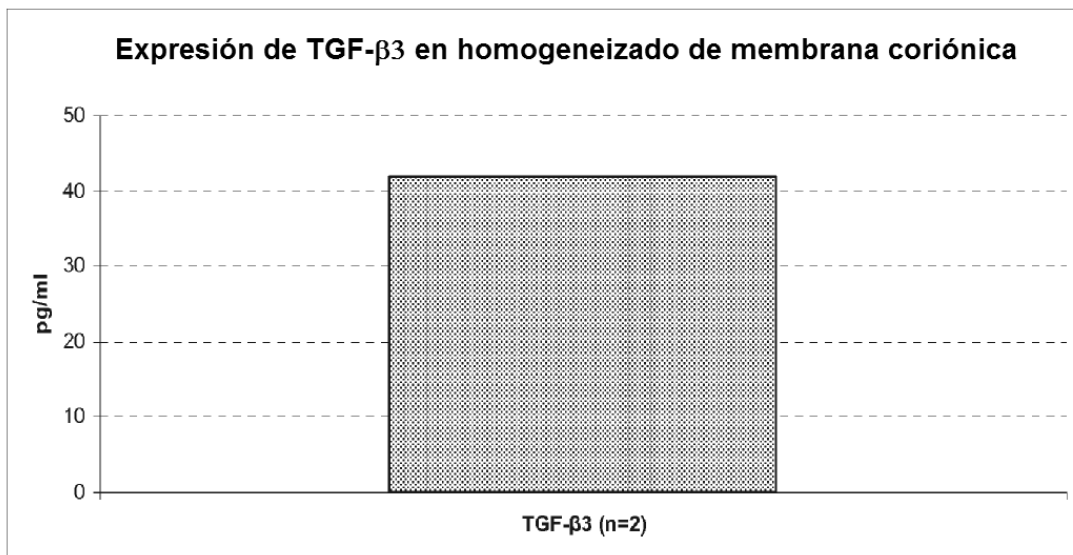


FIGURA 13A

Expresión de proteínas de reparación del hueso en homogeneizados de membrana coriónica

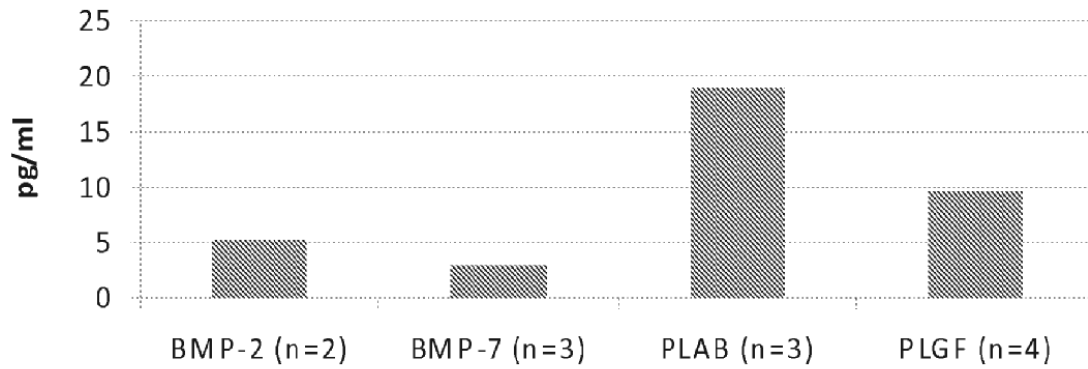


FIGURA 13B

Expresión de IGF-1 en homogeneizados de membrana coriónica

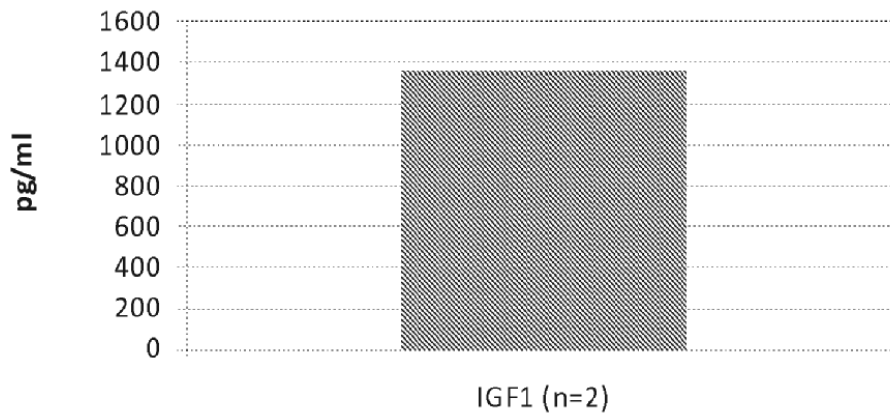


FIGURA 14

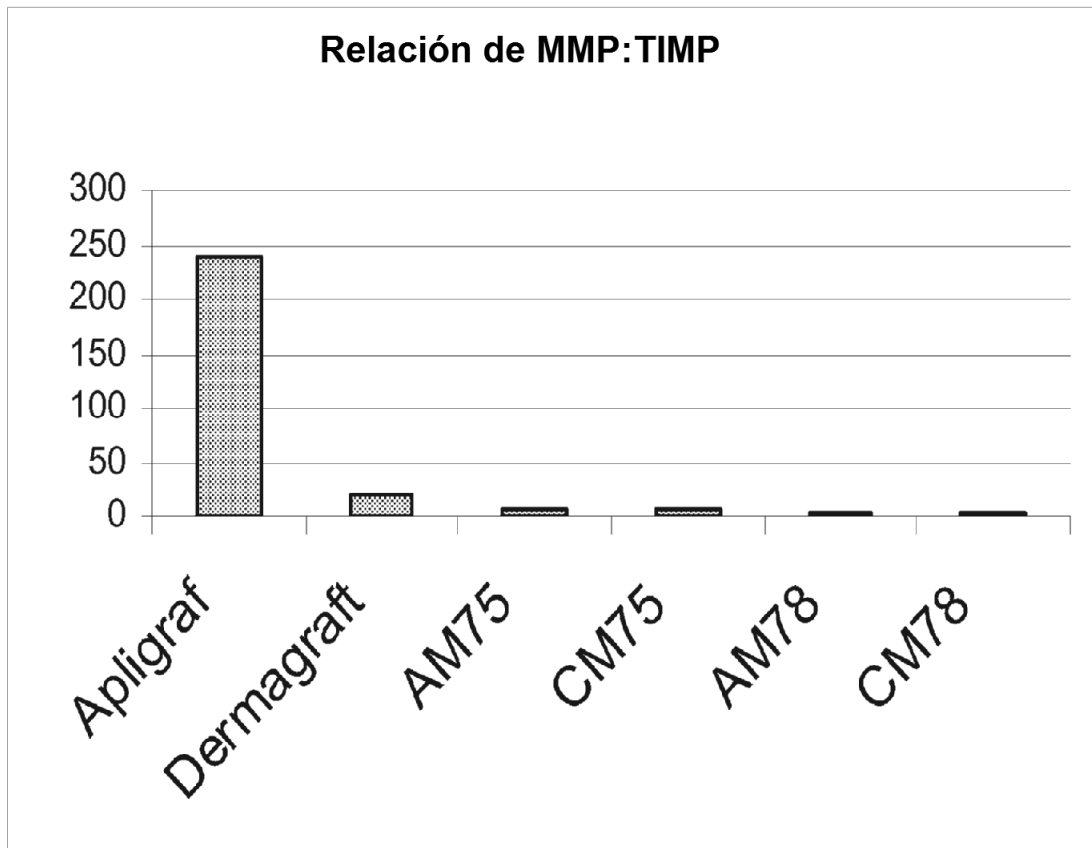


FIGURA 15

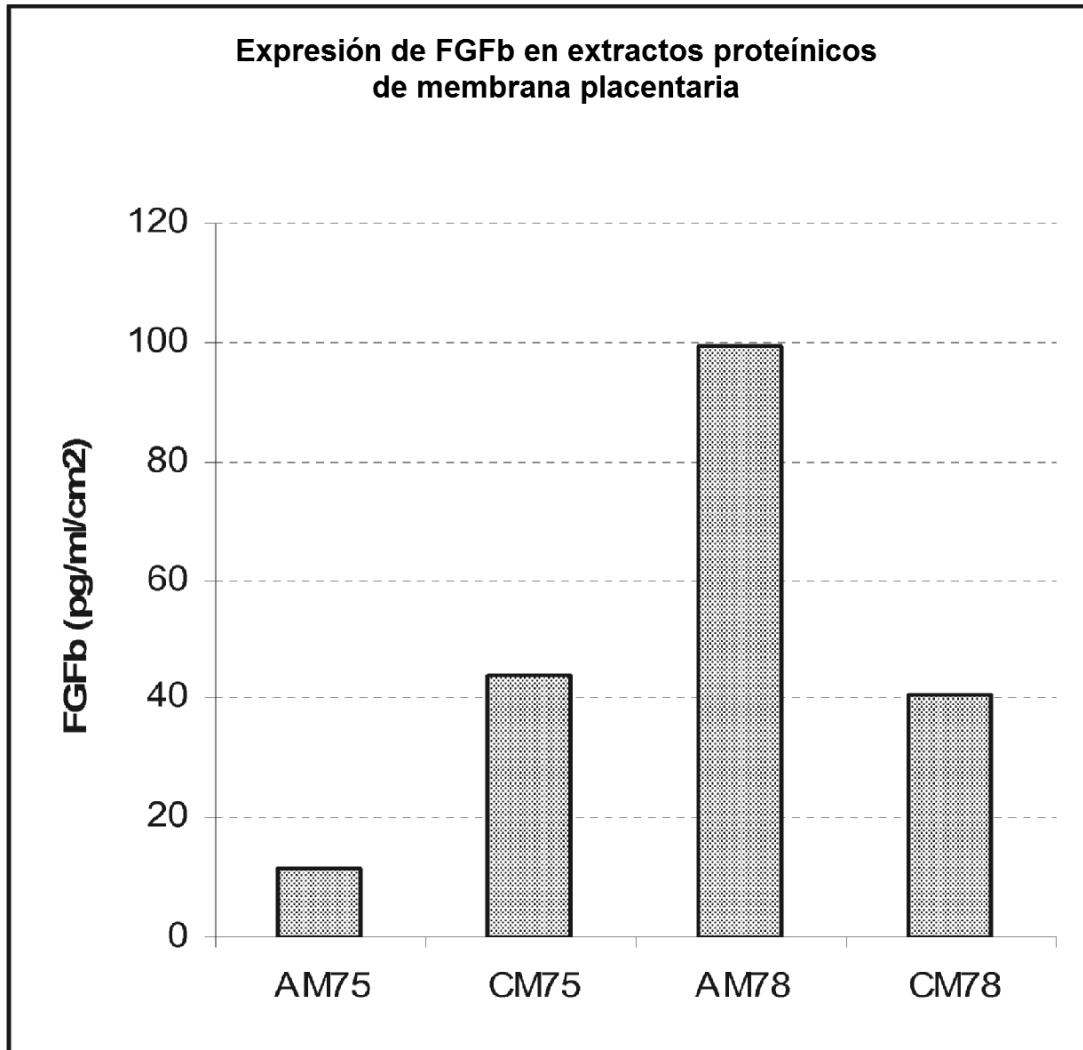


FIGURA 16

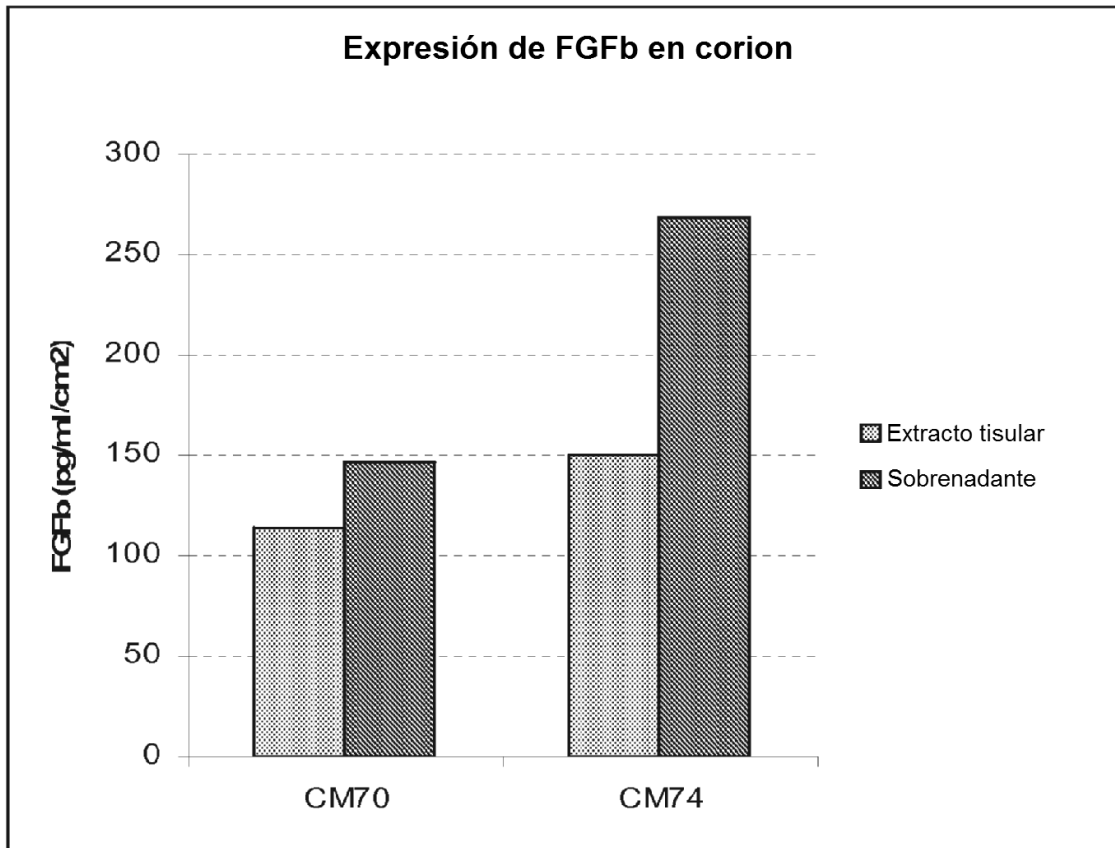


FIGURA 17

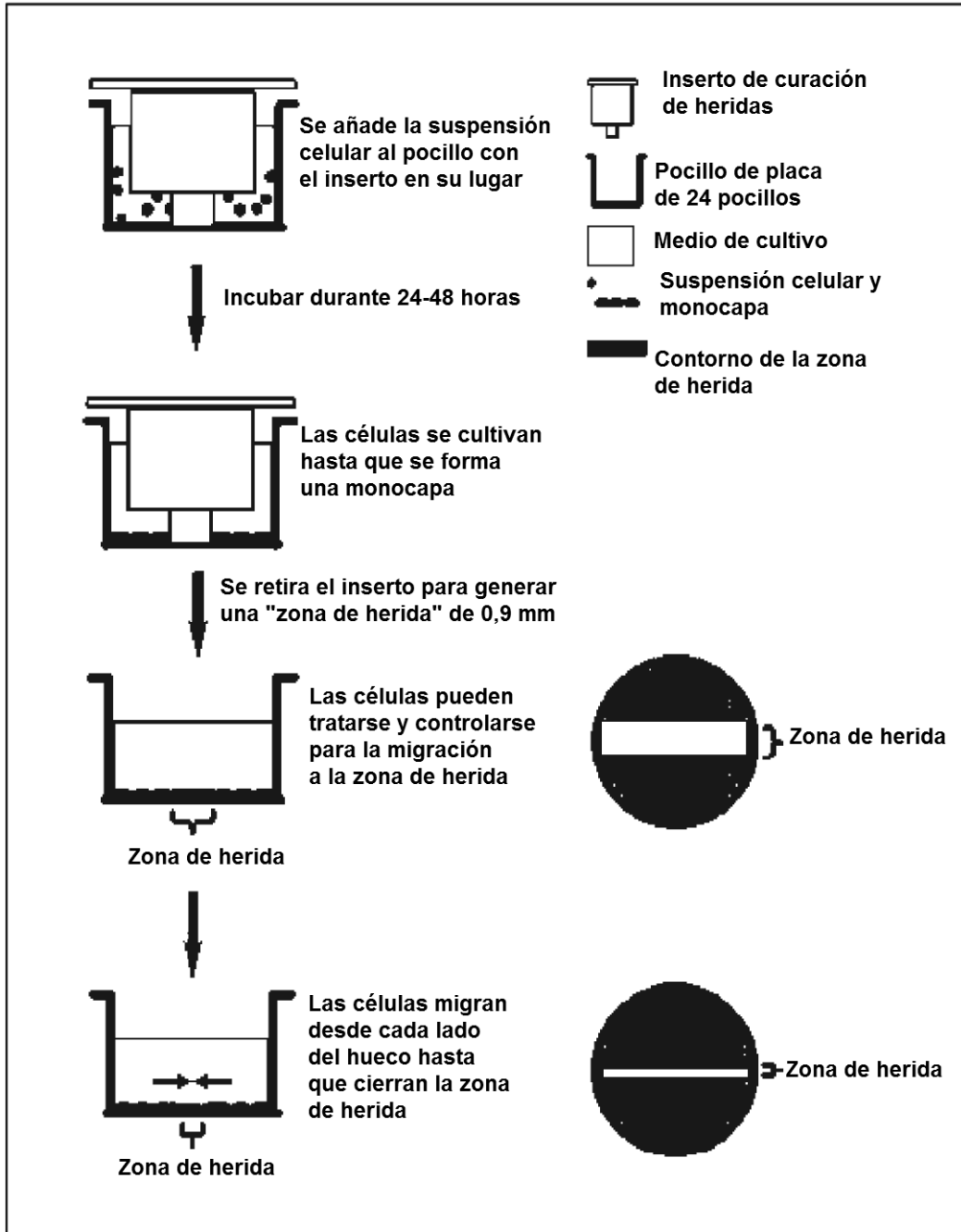


FIGURA 18

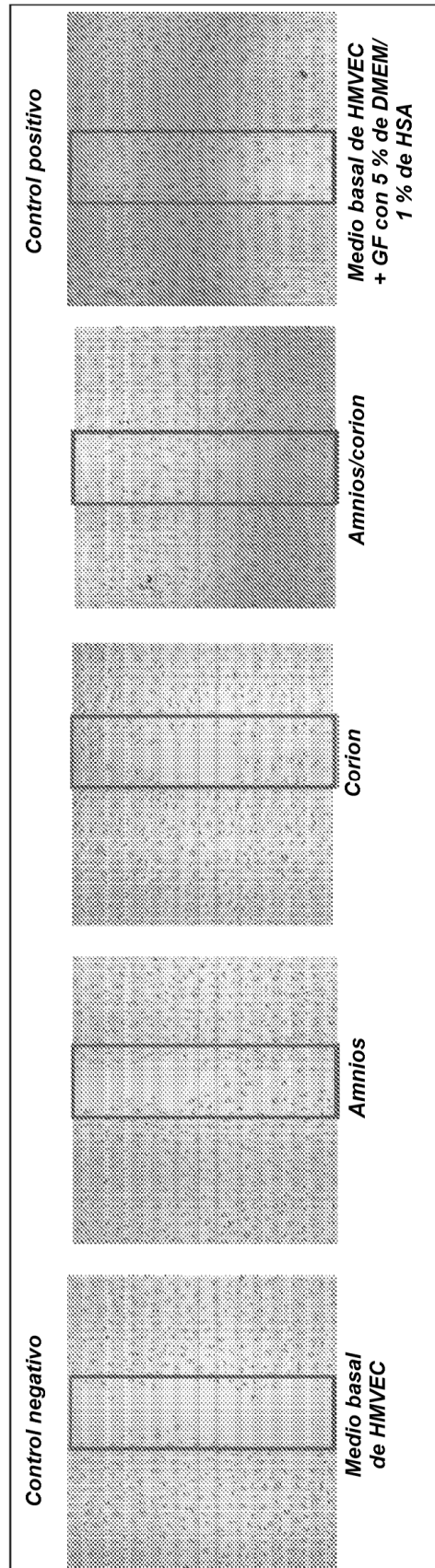


FIGURA 19A

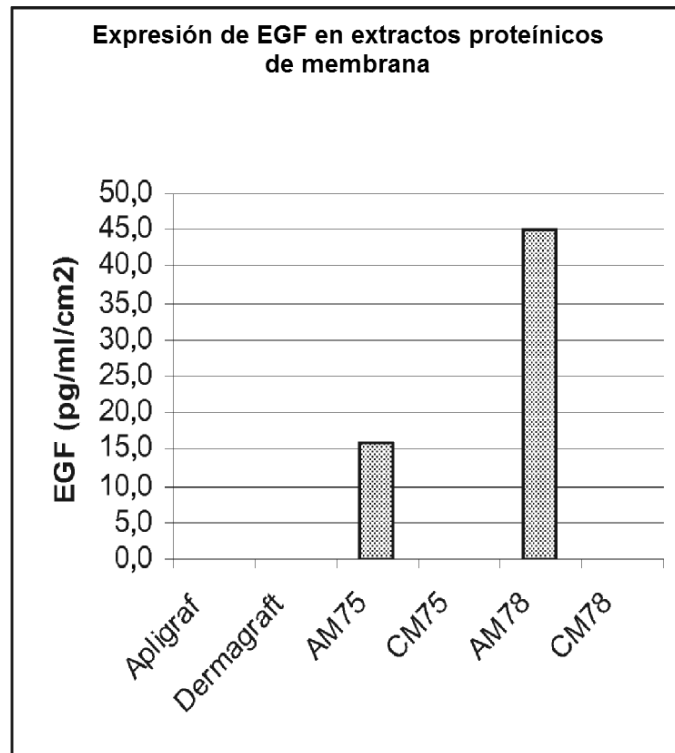


FIGURA 19B

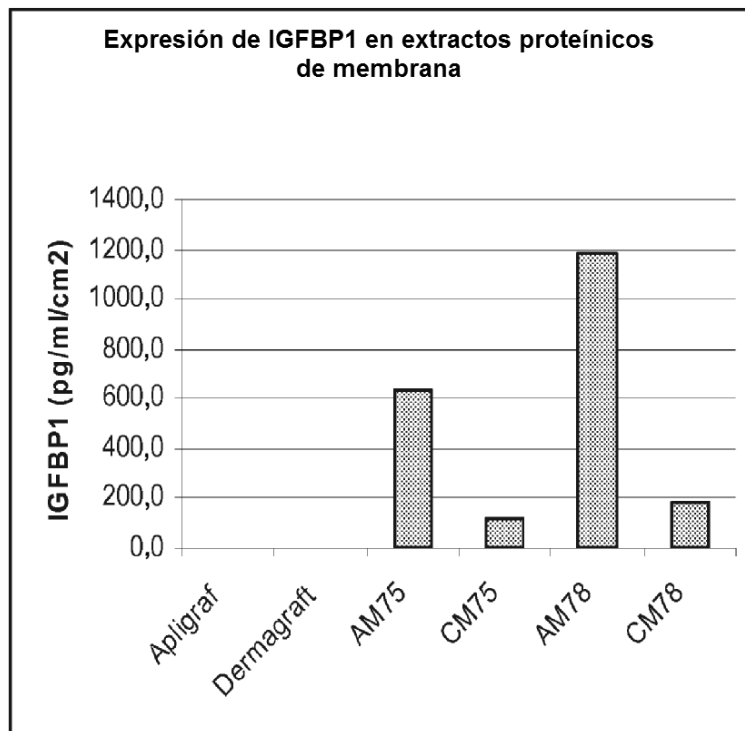


FIGURA 19C

