

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 599**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/50 (2015.01)

C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2010 E 15183125 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2977445**

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

30 Prioridad:

30.11.2009 US 272985 P

06.08.2010 US 371459 P

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

03.10.2018

73 Titular/es:

PLURISTEM LTD. (100.0%)

Matam Building 20

31905 Haifa, IL

72 Inventor/es:

ABERMAN, ZAMI

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 684 599 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 61/272.985, presentada el 30 de noviembre de 2009, y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 61/371.459, presentada el 6 de agosto de 2010.

10

CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células adherentes de la placenta que comprenden al menos un 70 % de células adherentes de una porción fetal de la placenta para su uso en terapia, en donde las células son de una fuente alogénica o xenogénica.

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

30

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

35

Las MSC derivadas de placenta presentan muchos marcadores comunes a las MSC aisladas de otros tejidos, por ejemplo CD105, CD73, CD90 y CD29, y la falta de expresión de marcadores celulares específicos hematopoyéticos, endoteliales y trofoblásticos. La diferenciación adipogénica, osteogénica y neurogénica se ha logrado después de cultivar MSC derivadas de placenta en las condiciones apropiadas [Yen et al., *Stem Cells* (2005) 23(1): 3-9]. Además, se ha demostrado que las MSC aisladas de placenta y cultivadas *in vitro* están inmunoprivilegiadas de manera similar a las MSC [Li et al., *Cell Res* (2005) 15(7): 539-47]. Por lo tanto, la placenta proporciona una fuente éticamente no controvertida y fácilmente accesible de las MSC para las aplicaciones experimentales y clínicas [Zhang et al., *Exp Hematol* (2004) 32(7): 657-64].

45 RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan poblaciones purificadas de células adherentes de la placenta que comprenden al menos un 70 % de células adherentes de una porción fetal de la placenta que pueden usarse en terapia, en donde las células son de una fuente alogénica o xenogénica.

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

55

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

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

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo tridimensional (3D) comprende un biorreactor 3D.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células adherentes en el cultivo 3D se realiza en perfusión.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células adherentes se realiza durante al menos 3 días.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células adherentes se realiza hasta que al menos el 10 % de las células adherentes están proliferando.

15

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

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, al menos el 10 % de las células adherentes están en un estado proliferativo; es decir, al menos el 10 % de las células adherentes están proliferando.

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

25

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

30 También se desvela una población de células adherentes derivadas de la placenta, en la que la población comprende al menos el 70 % de células adherentes de una porción materna de la placenta.

La porción materna de la placenta comprende decidua basal, decidua parietal, o tanto decidua basal como decidua parietal.

35

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una población de células adherentes derivadas de la placenta que comprende al menos el 70 % de células adherentes de una porción fetal de la placenta para su uso en terapia, en donde las células son de una fuente alogénica o xenogénica.

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la porción fetal de la placenta comprende amnios.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la porción fetal de la placenta consiste en amnios.

45 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la porción fetal de la placenta comprende vellosidades coriónicas.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la porción fetal de la placenta consiste en vellosidades coriónicas.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la población de células es una población en la que no más del 3,5 %, no más del 3 %, no más del 2 %, o no más del 1 % de la población de células adherentes de una porción materna expresan CD200 según se mide por citometría de flujo usando un control de isotipo para definir la expresión negativa.

55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden un diámetro celular que es menor que el de las células adherentes derivadas de una porción fetal de la placenta.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes comprenden una capacidad de proliferación celular que es mayor que la de las células adherentes derivadas de una porción fetal de la placenta.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes son capaces de suprimir una reacción inmune en menor medida que las células adherentes de una porción fetal de la placenta cuando se ensayan en un cultivo de linfocitos mixto.

5 También se divulga un medio acondicionado aislado de un cultivo que comprende cualquiera de las poblaciones de células anteriores.

10 También se divulga una composición farmacéutica que comprende como un principio activo cualquiera de la población de células descritas en el presente documento o cualquiera de los medios acondicionados descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 También se divulga un método para tratar una afección médica que puede aprovechar el trasplante celular o de órganos que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, tratando de este modo al sujeto.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona el uso de cualquiera de la población de células descritas en el presente documento, para su uso en terapia.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la afección se selecciona del grupo que consiste en isquemia, enfermedad arterial periférica (PAD), isquemia crítica de la pata (CLI), isquemia de la extremidad inferior, ictus, enfermedad vascular isquémica, enfermedad vascular del riñón, enfermedad coronaria isquémica, isquemia de miocardio, enfermedad arterial coronaria (CAD), enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad de arteria coronaria principal izquierda, enfermedad oclusiva arterial, isquemia periférica, enfermedad vascular periférica, 25 arteriosclerosis, retinopatía, reparación de retina, trastorno de remodelación, síndrome de von Hippel-Lindau, enfermedad vascular telangiectasiaisquémica hemorrágica hereditaria, enfermedad de Buerger, enfermedad renal isquémica, placenta isquémica, trastornos asociados con la reproducción, enfermedad de huésped frente a injerto, trasplante de órgano sólido, trasplante de células madre hematopoyéticas, diabetes, daño en tejido conectivo, cáncer, pre-cáncer, cáncer de hueso, osteosarcoma, metástasis ósea, fractura ósea, herida por quemadura, defecto 30 de cartílago articular, herida profunda, cicatrización de heridas retrasada, cicatrización de úlcera retrasada, quiste óseo subcondral, osteoporosis, osteoartritis, hueso degenerado, daño en cartílago, defecto de cartílago articular, tendones lesionados, enfermedades autoinmunes, trastornos metabólicos, psoriasis, dolor neuropático, lesión del nervio periférico, enfermedad neurodegenerativa, soporte de trasplante de riñón y enfermedades inflamatorias.

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la afección se selecciona del grupo que consiste en fallo cardíaco, infarto de miocardio, dolor neuropático, defecto del músculo esquelético, ictus y enfermedad cardíaca isquémica.

40 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, el uso es para el tratamiento de un defecto del músculo esquelético que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición que comprende células estromales adherentes derivadas de la placenta, tratando de este modo el defecto del músculo esquelético.

45 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, el uso es para tratar el dolor neuropático que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición que comprende células estromales adherentes derivadas de la placenta, tratando de este modo el dolor neuropático.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el dolor neuropático se asocia con dolor inflamatorio, polineuropatía diabética, neuropatía sensorial por virus de inmunodeficiencia humano (VIH), síndromes post-ictus, isquemia o esclerosis múltiple.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, el uso es para tratar el infarto de miocardio que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición que comprende células estromales adherentes derivadas de la placenta, tratando de este modo el infarto de miocardio.

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

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende como un principio activo células estromales adherentes derivadas de placenta para su uso en el tratamiento de defecto del músculo esquelético, dolor neuropático, o infarto de miocardio.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica para tratar el dolor neuropático que está asociado con dolor inflamatorio, polineuropatía diabética, neuropatía sensorial por virus de inmunodeficiencia humano (VIH), síndromes post-ictus, isquemia o esclerosis múltiple.

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

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

15

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes expresan uno o más de beta-endorfina, dinorfina A, leu-enkefalina o met-enkefalina.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células adherentes suprimen la actividad de los linfocitos T.

20

También se desvelan células adherentes que comprenden al menos un 70 % de células adherentes procedentes de una porción materna de la placenta.

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

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la porción materna de la placenta comprende decidua basal, decidua parietal, o tanto decidua basal como decidua parietal.

30

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

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo tridimensional (3D) comprende un biorreactor 3D.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, el cultivo 3D se realiza bajo perfusión.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células adherentes se realiza durante al menos 3 días.

40

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

45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en la práctica o ensayo de realizaciones de la invención, se describen a continuación métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de patente, incluyendo las definiciones.

50 Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para propósitos de análisis ilustrativo de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden ponerse en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

- 5 La Figura 1 es una ilustración esquemática de la estructura y porciones de la placenta.
 La Figura 2A-C son fotomicrografías que muestran la morfología de células adherentes derivadas de placenta decidua basal (A), estroma veloso (B) y membrana amniótica (C).
 La Figura 3 es un gráfico que muestra el diámetro de la célula frente al número de pases de células de diferentes porciones de placenta.
 10 La Figura 4 es un gráfico que muestra la duplicación de población frente al número de pases de células de diferentes porciones de placenta.
 Las Figuras 5A-B son histogramas que muestran las propiedades de inmunomodulación *in vitro* de las diversas porciones de placenta. La Figura 5A muestra los resultados de cuatro experimentos diferentes mientras las Figura 5B muestra el promedio de los resultados obtenidos en la Figura 5A, incluyendo la desviación estándar.
 15 Las Figuras 6A-C son gráficos de barras que muestran el efecto de medio acondicionado de células adherentes de diversas porciones de placenta en la proliferación celular endotelial.
 La Figura 7 muestra los valores de fuerza de contracción en ratas tratadas con PLX ("PLX") y de control ("Sham"). "I" - trasplante inmediato después del trauma; "DEL" - trasplante 7 días después del trauma; "FT" - fuerza de contracción de sacudida rápida; "TET" - fuerza de contracción titánica.
 20 Las Figuras 8A y 8B muestran los efectos de células PLX en dolor inflamatorio en el ensayo de presión de la pata. La Figura 8A representa el umbral de presión de la pata en función del tiempo en la pata inflamada. La Figura 8B muestra la misma información para la pata contralateral.
 Las Figuras 9A y 9B muestran el volumen de pata representado en función del tiempo después de la administración de células PLX en la pata inflamada (Figura 9A) y la pata contralateral (Figura 9B).
 25 Las Figuras 10A y 4B ilustran los efectos de células PLX sobre la sensibilidad mecánica (ensayo de von Frey) en dolor neuropático en la pata ipsilateral (Figura 10A) y la pata contralateral (Figura 10B).
 Las Figuras 11A y 5B representan los efectos de células PLX sobre la sensibilidad térmica (ensayo de Hargreaves) en dolor neuropático en la pata ipsilateral (Figura 11A) y la pata contralateral (Figura 11B).
 Las Figuras 12A-E representan los niveles de beta-endorfina (Figura 12A), dinorfina A (Figura 12B), leu-encefalina (Figura 12C), met-encefalina (Figura 12D), y total (Figura 12E) en 9 lotes de PLX diferentes.
 30

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

35 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células adherentes de la placenta que comprenden al menos un 70 % de células adherentes de una porción fetal de la placenta para su uso en terapia, en donde las células son de una fuente alogénica o xenogénica.

40 Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ponerse en práctica o realizarse de diversas maneras.

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

50 Además, el presente inventor ha previsto un método para aislar poblaciones celulares altamente purificadas de diferentes porciones de placenta (véase la sección Ejemplos a continuación). Sorprendentemente, se descubrió que las poblaciones celulares aisladas de porciones maternas de la placenta se caracterizan por propiedades morfológicas y funcionales únicas que son distintas de otras poblaciones celulares aisladas de fracciones de placenta fetal (véase sección de Ejemplos a continuación). Estas células son valiosas para el tratamiento de una miríada de afecciones médicas.

55 También se divulga una población de células adherentes que comprende al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o incluso el 100 % de células de una porción materna de placenta.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una población de células que comprende al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o incluso el 100 % de

células adherentes de una porción fetal de placenta.

De acuerdo con realizaciones específicas, la porción fetal de la placenta comprende amnios.

5 De acuerdo con realizaciones específicas, la porción fetal de la placenta consiste en amnios.

De acuerdo con realizaciones específicas, la porción fetal de la placenta comprende vellosidades coriónicas.

De acuerdo con realizaciones específicas, la porción fetal de la placenta consiste en vellosidades coriónicas.

10

Como se usa en el presente documento, el término "placenta" se refiere al órgano mamífero que conecta el feto en desarrollo a la pared uterina. Después del nacimiento, la placenta se expulsa (y se denomina como una placenta post-parto).

15 La placenta se perfunde preferiblemente durante un periodo de tiempo suficiente para eliminar células residuales (por ejemplo, sangre).

Como se usa en el presente documento, "porción fetal de placenta" se refiere a cualquier porción de la placenta que no sea materna (véase la Figura 1 para una ilustración estructural).

20

Como se usa en el presente documento, "porción materna de placenta" se refiere a cualquier porción de la placenta que no sea fetal (véase la Figura 1 para una ilustración estructural), por ejemplo, las porciones de la placenta que se derivan de la decidua basal o decidua parietal.

25 Las porciones fetales de placenta incluyen el amnios, corión o vellosidades coriónicas, véase la Figura 1.

Los métodos de disección de la placenta para obtener células se conocen bien en la técnica. Algunos se describen en detalle en la sección de Ejemplos a continuación.

30 Las muestras de tejido se lavan en un tampón fisiológico [por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón de Hank]. Las suspensiones de célula única se hacen tratando el tejido con una enzima digestiva (véase a continuación) y/o picando y enjuagando las partes de tejido a través de un filtro de nylon o por adición de pipeteo suave (Falcon, Becton, Dickinson, San Jose, CA) con medio de lavado.

35 Las células adherentes aisladas de las diversas porciones de placenta pueden derivarse tratando el tejido con una enzima digestiva tal como colagenasa, tripsina y/o dispasa; y/o concentraciones eficaces de hialuronidasa o ADNasa; y ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA); a temperatura entre 25 - 50 °C, durante periodos de entre 10 minutos a 3 horas. Las células pueden pasarse entonces a través de un filtro de malla de nylon o estopilla de entre 20 micrómetros a 1 mm. Las células se centrifugan a velocidades de entre 100 a 3000 x g durante periodos de entre 40 1 minuto a 1 hora a temperaturas de entre 4- 50 °C (véase la Pat. de Estados Unidos N.º 7.078.230).

La recuperación celular se realiza preferiblemente en condiciones asépticas. Una vez que se obtienen células aisladas, se dejan adherir a un material adherente (por ejemplo, configurado como una superficie), y aislar de este modo células adherentes.

45

Como se usa en el presente documento, la frase "células adherentes" se refiere a células que son dependientes del anclaje, es decir, requieren unión a una superficie para crecer *in vitro*.

50 Como se usa en el presente documento, "un material adherente" se refiere a un material de origen natural o una combinación del mismo de un material no citotóxico (es decir, biológicamente compatible) que tiene una estructura química (por ejemplo, grupos expuestos de superficie cargada) que puede retener las células en una superficie.

Los ejemplos de materiales adherentes que pueden usarse de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen, pero sin limitación, un poliéster, un polipropileno, un polialquileño, un polifluorocloroetileno, un cloruro de polivinilo, 55 un poliestireno, una polisulfona, un acetato de celulosa, una fibra de vidrio, una partícula cerámica, un matrigel, un componente de matriz extracelular (por ejemplo, fibronectina, vitronectina, condronectina, laminina), un colágeno, un ácido L poliláctico, un dextrano y una fibra metálica inerte.

Las etapas adicionales de purificación o enriquecimiento para células adherentes pueden realizarse usando métodos

que se conocen bien en la técnica (tal como mediante FACS usando expresión de marcador, como se describe adicionalmente en el presente documento a continuación).

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

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, la frase "cultivo bidimensional" se refiere a un cultivo en que las células se disponen a condiciones que son compatibles con el crecimiento celular mientras se permite que las células crezcan en un plano. Las condiciones en el cultivo bidimensional de la invención se diseñan para permitir la expansión de las células adherentes.

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

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

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

- 5 Como se usa en el presente documento, los términos "que mantiene" y "mantenimiento" se refieren a renovación celular sustancialmente de menos diferenciación, es decir, una población celular sustancialmente estacionaria sin diferenciación que acompañe dicha estacionalidad.

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

De acuerdo con una realización de la presente invención, las células se cultivan en un medio de cultivo desprovisto de complementos antibióticos desde al menos el pase 2, al menos el pase 3, o al menos el pase 4.

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

20 Para el cultivo 3D, las células adherentes pueden transferirse a una matriz configurada en 3D inmediatamente después del aislamiento, o como alternativa, pueden pasarse a configuraciones tridimensionales después de condiciones bidimensionales (2D). A veces puede necesitarse la crioconservación de células entre el cultivo 2D y el cultivo 3D.

25 Por lo tanto, el material adherente según algunas realizaciones se configura para el cultivo 3D proporcionando de este modo una matriz de crecimiento que aumenta sustancialmente la superficie de unión disponible para la adherencia de las células para así imitar la infraestructura del tejido (es decir, la placenta).

30 Para una producción a gran escala, el cultivo puede realizarse en un biorreactor 3D.

Los ejemplos de dichos biorreactores incluyen, pero sin limitación, un biorreactor de flujo de pistón, un biorreactor de tanque agitado continuo, un biorreactor de lecho estacionario (biorreactor de lecho empaquetado) y un biorreactor de lecho fluido.

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

Otros biorreactores 3D que pueden usarse con la invención incluyen, pero sin limitación, un biorreactor de tanque agitado continuo, donde un medio de cultivo se suministra de forma continua al biorreactor y el medio usado se
45 extrae de forma continua, para mantener un estado continuo constante en el tiempo en el biorreactor. El biorreactor de tanque agitado puede usarse con lecho fluido (vehículos suspendidos) o una cesta de lecho fibroso (que está disponible, por ejemplo, en New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ), un biorreactor de lecho estacionario, un biorreactor de agitación por aire, donde el aire se suministra típicamente en el fondo de un tubo de aspiración central que fluye hacia arriba mientras se forman burbujas, y que separa el gas de escape en la parte superior de la
50 columna, un biorreactor con espumas poliactivas [como se describe en Wendt, D. et al., *Biotechnol Bioeng* 84: 205-214, (2003)], un soporte poroso en un biorreactor de perfusión de flujo radial [como se describe en Kitagawa et al., *Biotechnology and Bioengineering* 93(5): 947-954 (2006)], un biorreactor de flujo radial con soporte o vehículos, un biorreactor de fibra hueca, y microvehículos. Otros biorreactores que pueden usarse de acuerdo con la invención se describen en las Pat. de Estados Unidos N.º 6.277.151, 6.197.575, 6.139.578, 6.132.463, 5.902.741 y 5.629.186.

55 En una realización ejemplo, se siembran un total de $200 \pm 100 \times 10^6$ células, se siembran $3-10 \times 10^6$ células/g de vehículo, o se siembran $0,06-0,2 \times 10^6$ células/ml. De acuerdo con una realización ejemplar, la siembra de células se realiza en discos Fibracel de 2000-9000 células/cm².

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

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

10 De acuerdo con una realización de la presente invención, el cultivo celular se realiza en perfusión del medio de cultivo. Típicamente, la velocidad de perfusión se determina por la concentración de glucosa en el medio de cultivo de las células adherentes. Por lo tanto, de acuerdo con las presentes enseñanzas, el medio de cultivo puede cambiarse cuando la concentración de glucosa es aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 550 mg/l o aproximadamente 600 mg/l.

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

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

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

25 Por lo tanto, por ejemplo, las células pueden tener una forma de huso. Como alternativa o adicionalmente, las células pueden expresar un marcador o una colección de marcadores (por ejemplo, marcador de superficie) típico de las células estromales. Los ejemplos de marcadores de superficie de célula estromal (positivos y negativos) incluyendo, pero sin limitación, CD105⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, D7-fib⁺, CD3⁻, CD4⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD80⁻,
30 CD5⁻, CD20⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD79⁻, HLA-DR⁻, CD31⁻, KDR⁻, y FMC7⁻.

Otros marcadores de célula estromal incluyen, pero sin limitación, tirosina hidroxilasa, nestina y H-NF.

De acuerdo con una realización específica de la invención, las células adherentes, incluyendo las derivadas tanto de
35 una porción materna como de una porción fetal de la placenta, no expresan el marcador de células madre CD271.

Como se usa en el presente documento, la frase "célula madre" se refiere a una célula que no está diferenciada de forma terminal.

40 De acuerdo con una realización específica de la invención, las células adherentes derivadas de una porción fetal de la placenta (por ejemplo, que consiste en o comprende vellosidades coriónicas) se caracterizan por una expresión de CD200 positiva (véase la sección de Ejemplos a continuación).

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

Los ejemplos de fenotipos funcionales típicos de células estromales incluyen, pero sin limitación, actividad de supresión de linfocitos T (no estimulan los linfocitos T y en cambio suprimen los mismos, por ejemplo, cuando se
50 ensaya en un cultivo de linfocitos mixto) y actividad de soporte de células madre hematopoyéticas.

De acuerdo con una realización ejemplar, las células adherentes de la presente invención están menos comprometidas a la diferenciación en líneas osteogénicas o adipogénicas en comparación con células adherentes de la médula ósea que crecen y se diferencian en las mismas condiciones. Por ejemplo, de acuerdo con una
55 realización ejemplar, las células adherentes de la presente invención no se diferencian en líneas osteogénicas o adipogénicas cuando crecen en las condiciones descritas en los Ejemplos 4-7 del documento WO2010026575.

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

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

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

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

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

De acuerdo con una realización específica, las células pueden ser de fuente alogénica o xenogénica. También se divulgan células de fuente autóloga o singénica.

De acuerdo con otra realización específica, las células pueden modificarse genéticamente para expresar una proteína heteróloga.

De acuerdo con aún otra realización específica, las células no están genéticamente modificadas.

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

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

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

El medio de crecimiento puede ser cualquier medio de crecimiento adecuado para cultivar las células de placenta adherentes de la presente invención, como se ha descrito anteriormente en el presente documento. El medio de crecimiento puede complementarse con factores nutricionales, tales como aminoácidos, (por ejemplo, L-glutamina), anti-oxidantes (por ejemplo, beta-mercaptoetanol) y factores de crecimiento. El suero y/o reemplazos de suero se añaden a intervalos de concentración eficaces de hasta el 20 %.

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

La selección del aparato de cultivo para acondicionar el medio se basa en la escala y el propósito del medio acondicionado. La producción a gran escala implica preferiblemente el uso de biorreactores como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Después de la acumulación de factores adecuados en el medio, el medio de crecimiento (es decir, el medio acondicionado) se separa de las células y se recoge. Se apreciará que las células

pueden usarse de forma repetida para acondicionar lotes adicionales de medio durante periodos de cultivo adicionales, con la condición de que las células conserven su capacidad para acondicionar el medio.

El medio acondicionado de la presente invención puede administrarse directamente (como se describe 5 adicionalmente a continuación) o extraerse para concentrar el factor eficaz tal como por filtración de sal. Para un uso futuro, el medio acondicionado se almacena preferiblemente congelado a -80 °C.

Las células adherentes de porciones fetales pueden usarse en diversos marcos de investigación tal como para 10 ensayar sus propiedades biológicas (por ejemplo, morfología, tamaño) con respecto a las porciones maternas (véase, por ejemplo, la sección de Ejemplos).

Las poblaciones purificadas de células de la placenta descritas en el presente documento pueden usarse en terapia.

Como se usa en el presente documento, el término "afección" se refiere a cualquier patología (enfermedad, afección, 15 síndrome o trastorno) que puede beneficiarse del trasplante de células (por ejemplo, célula estromal) u órganos. Los ejemplos incluyen afecciones isquémicas, afecciones cardiovasculares, afecciones del sistema nervioso, afecciones del tracto gastrointestinal, afecciones ortopédicas, afecciones hematopoyéticas, afecciones renales y afecciones hepáticas, tales como, pero sin limitación, enfermedad arterial periférica (PAD), tal como isquemia de los miembros inferiores e isquemia crítica de los miembros inferiores (CLI), isquemia de la extremidad inferior, enfermedad 20 vascular isquémica, ictus, enfermedad cardíaca isquémica, isquemia de miocardio, infarto de miocardio agudo (MI), enfermedad de la arteria coronaria (CAD), enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad de la arteria coronaria principal izquierda, enfermedad oclusiva arterial, isquemia periférica, enfermedad vascular periférica, arteriosclerosis, retinopatía, reparación de retina, trastorno remodelador, síndrome de von Hippel-Lindau, enfermedad vascular telangiectasiásica hemorrágica hereditaria, enfermedad de Buerger, diabetes, 25 enfermedad vascular del riñón, enfermedad renal isquémica, enfermedad hepática, placenta isquémica, trastornos asociados con la reproducción, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), trasplante de órgano sólido, trasplante de célula madre hematopoyética (HSCT), afecciones inflamatorias del tracto gastrointestinal (GI), colitis ulcerosa, cicatrización de heridas retrasada, cicatrización de úlceras retrasada, cáncer (por ejemplo, cáncer de mama), pre-cáncer, afecciones caracterizadas por daño del tejido conectivo tal como cáncer óseo, osteosarcoma, 30 metástasis ósea, fractura ósea, enfermedad degenerativa del disco, osteogénesis imperfecta (OI), quemaduras, herida por quemaduras, defecto del cartilago articular, herida profunda, cicatrización de heridas retrasada, cicatrización de úlcera retrasada, trastornos metabólicos, psoriasis, dolor neuropático, lesión del nervio periférico, soporte del trasplante de riñón, quiste óseo subcondrial, osteoporosis, osteoartritis (OA), hueso degenerado, daño del cartilago articular, tendones lesionados (por ejemplo, lesiones de tendones inducidos por 35 sobrecarga) y ligamentos lesionados.

La enfermedad/afección isquémica es una afección médica en la que el tejido entra en un estado isquémico debido a un reducido flujo sanguíneo en la vasculatura provocado por diversos factores, tales como constricción del lumen del vaso sanguíneo, desarrollo de coágulos de sangre, oclusión del vaso sanguíneo, vasculitis, estrechamiento de vasos 40 sanguíneos o un aumento en la viscosidad de la sangre. Las enfermedades isquémicas incluyen trastorno vascular periférico, enfermedad cardíaca isquémica (por ejemplo, cardiomiopatía isquémica, infarto de miocardio, fallo cardíaco isquémico), enfermedad cerebrovascular isquémica, incluyendo ictus, enfermedad isquémica del riñón, enfermedad isquémica del pulmón y enfermedades isquémicas asociadas con enfermedades infecciosas. Los ejemplos no limitantes adicionales de enfermedades isquémicas (también denominadas en el presente documento 45 como isquemia) se enumeran a lo largo de la solicitud.

El trastorno vascular periférico es una afección médica en la que el tejido periférico entra en un estado isquémico debido a un reducido flujo sanguíneo arterial periférico provocado, por ejemplo, por la constricción del lumen del vaso sanguíneo, desarrollo de coágulos de sangre, oclusión de vasos sanguíneos, vasculitis, estrechamiento de 50 vasos sanguíneos o un aumento en la viscosidad de la sangre. Las enfermedades asociadas con el trastorno vascular periférico incluyen enfermedades oclusivas arteriales crónicas tales como arteriosclerosis ocluyente y enfermedad de Buerger, y esclerosis sistémica progresiva, eritematoso sistémico, enfermedad de Raynaud, síndrome de vibración, aneurisma y vasculitis. Los ejemplos no limitantes adicionales de enfermedades isquémicas periféricas se enumeran a lo largo de la solicitud. 55

De acuerdo con una realización específica la afección es fallo cardíaco, infarto de miocardio, dolor neuropático, defecto del músculo esquelético y enfermedad isquémica cardíaca.

El medio acondicionado descrito en el presente documento se usa para tratar el ictus.

Como se usa en el presente documento, "ictus" o "ataque cerebrovascular agudo" se refiere a la pérdida de desarrollo rápidamente de la función o funciones cerebrales debido a la interrupción en el suministro de sangre al cerebro. Esto puede deberse a isquemia (falta de suministro de glucosa y oxígeno) provocada por trombosis o embolia o debido a una hemorragia (hemorragia subaracnoidea o hemorragia intracerebral).

Se apreciará que las células de la presente invención son capaces de inducir la inmunosupresión y/o la tolerancia y/o son capaces de inducir la angiogénesis en un sujeto. Por lo tanto, las células adherentes o medios acondicionados derivados de las mismas pueden usarse para tratar cualquier afección que necesite angiogénesis y/o inmunosupresión y/o tolerancia. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias (incluyendo enfermedades inflamatorias agudas y crónicas) incluyendo, pero sin limitación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumatoideas, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conectivo y enfermedades sistémicas.

Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunes incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis (Matsuura E. et al., *Lupus*. 1998;7 Suppl 2:S135), infarto de miocardio (Vaarala O. *Lupus*. 1998;7 Suppl 2:S132), trombosis (Tincani A. et al., *Lupus* 1998;7 Suppl 2:S107-9), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. et al., *Wien Klin Wochenschr* 2000 Aug 25;112 (15-16):660), enfermedad autoinmune anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al., *Semin Thromb Hemost*.2000;26 (2):157), vasculitis necrotizante de los vasos sanguíneos pequeños, poliangiitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrotizante y crescénica focal de depósitos inmunes (Noel LH. *Ann Med Interne (Paris)*. 2000 May;151 (3):178), síndrome antifosfolípido (Flamholz R. et al., *J Clin Apheresis* 1999;14 (4):171), insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos (Wallukat G. et al., *Am J Cardiol*. 1999 Jun 17;83 (12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann Ital Med Int*. 1999 Apr-Jun;14 (2):114; Semple JW. et al., *Blood* 1996 May 15;87 (10):4245), anemia hemolítica autoinmune (Efremov DG. et al., *Leuk Lymphoma* 1998 Jan;28 (3-4):285; Sallah S. et al., *Ann Hematol* 1997 Mar;74 (3):139), autoinmunidad cardíaca en enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. et al., *J Clin Invest* 1996 Oct 15;98 (8):1709) y autoinmunidad de anti-linfocitos T auxiliares (Caporossi AP. et al., *Viral Immunol* 1998;11 (1):9).

Los ejemplos de enfermedades reumatoideas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide (Krenn V. et al., *Histol Histopathol* 2000 Jul;15 (3):791; Tisch R, McDevitt HO. *Proc Natl Acad Sci units S A* 1994 Jan 18;91 (2):437) y espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel et al., *Arthritis Res* 2001; 3 (3): 189).

Los ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunes incluyen, pero sin limitación, enfermedad pancreática, diabetes tipo I, enfermedad de tiroides, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad de ovario, infertilidad anti-esperma autoinmune, prostatitis autoinmune, y síndrome poliglandular autoinmune tipo I, las enfermedades incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunes del páncreas, diabetes tipo I (Castano L. y Eisenbarth GS. *Ann. Rev. Immunol*. 8:647; Zimmet P. *Diabetes Res Clin Pract* 1996 Oct;34 Suppl:S125), enfermedades tiroideas autoinmunes, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000 Jun;29 (2):339; Sakata S. et al., *Mol Cell Endocrinol* 1993 Mar;92 (1):77), tiroiditis autoinmune espontánea (Braley-Mullen H. and Yu S, *J Immunol* 2000 Dec 15;165 (12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., *Nippon Rinsho* 1999 Aug;57 (8):1810), mixedema idiopático (Mitsuma T. *Nippon Rinsho*. 1999 Aug;57 (8):1759), autoinmunidad de ovario (Garza KM. et al., *J Reprod Immunol* 1998 Feb;37 (2):87), infertilidad anti-esperma autoinmune (Diekman AB. et al., *Am J Reprod Immunol*. 2000 Mar;43 (3):134), prostatitis autoinmune (Alexander RB. et al., *Urology* 1997 Dec;50 (6):893) y síndrome poliglandular autoinmune tipo I (Hara T. et al., *Blood*. 1991 Mar 1;77 (5):1127).

Los ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunes incluyen, pero sin limitación, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (Garcia Herola A. et al., *Gastroenterol Hepatol*. 2000 Jan;23 (1):16), enfermedad celíaca (Landau YE. y Shoenfeld Y. *Harefuah* 2000 Jan 16;138 (2):122), colitis, ileítis y enfermedad de Crohn.

Los ejemplos de enfermedades cutáneas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, enfermedades de piel ampollosa autoinmune, tales como, pero sin limitación, pénfigo vulgar, pénfigoide ampolloso y pénfigo foliáceo.

Los ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmune (Franco A. et al., *Clin Immunol Immunopathol* 1990 Mar;54 (3):382), cirrosis biliar primaria (Jones DE. *Clin Sci (Colch)* 1996 Nov;91 (5):551; Strassburg CP. et al., *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Jun;11 (6):595) y hepatitis autoinmune (Manns MP. *J Hepatol* 2000 Aug;33 (2):326).

Los ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, esclerosis múltiple (Cross AH. et al., J Neuroimmunol 2001 Jan 1;112 (1-2):1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. et al., J Neural Transm Suppl. 1997;49:77), miastenia gravis (Infante AJ. And Kraig E, Int Rev Immunol 1999;18 (1-2):83; Oshima M. et al., Eur J Immunol 1990 Dec;20 (12):2563), neuropatías, neuropatías motoras (Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May;7 (3):191); síndrome de Guillain-Barre y neuropatías autoinmunes (Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):234), miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):204); enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelar paraneoplásica y síndrome de la persona rígida (Hiemstra HS. et al., Proc Natl Acad Sci units S A 2001 Mar 27;98 (7):3988); síndrome de la persona rígida no paraneoplásica, atrofias cerebelares progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunes (Antoine JC. y Honnorat J. Rev Neurol (Paris) 2000 Jan;156 (1):23); neuropatías disímunes (Nobile-Orazio E. et al., Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 1999;50:419); neuromiotonia adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. et al., Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13;841:482), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May;57 (5):544) y enfermedades neurodegenerativas.

Los ejemplos de enfermedades musculares autoinmunes incluyen, pero sin limitación, miositis, miositis autoinmune y síndrome de Sjogren primario (Feist E. et a., Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep;123 (1):92) y enfermedad autoinmune del músculo liso (Zauli D. et al., Biomed Pharmacother 1999 Jun;53 (5-6):234).

Los ejemplos de enfermedades néfricas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, nefritis y nefritis intersticial autoinmune (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Aug;1 (2):140).

Los ejemplos de enfermedades autoinmunes relacionadas con la reproducción incluyen, pero sin limitación, pérdida fetal repetida (Tincani A. et al., Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9).

Los ejemplos de enfermedades de tejido conectivo autoinmunes incluyen, pero sin limitación, enfermedades de oído, enfermedades de oído autoinmunes (Yoo TJ. et al., Cell Immunol 1994 Aug; 157 (1):249) y enfermedades autoinmunes del oído interno (Gloddek B. et al., Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29;830:266).

Los ejemplos de enfermedades sistémicas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, lupus sistémico eritematoso (Erikson J. et al., Immunol Res 1998;17 (1-2):49) y esclerosis sistémica (Renaudineau Y. et al., Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar;6 (2):156); Chan OT. et al., Immunol Rev 1999 Jun;169:107).

Además, las células adherentes o medios acondicionados pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con trasplante de un injerto incluyendo, pero sin limitación, rechazo de injerto, rechazo crónico de injerto, rechazo subagudo de injerto, rechazo hiperagudo de injerto, rechazo agudo de injerto y enfermedad de injerto contra huésped.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere inhibir o frenar el desarrollo de una patología y/o provocar la reducción, remisión o regresión de una patología. Los expertos en la técnica entenderán que pueden usarse diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una patología, y de forma similar, pueden usarse diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de una patología. El término "tratar" puede referirse también a aliviar o disminuir un síntoma asociado con la patología.

El sujeto tratado mediante las células adherentes o medios acondicionados puede ser cualquier sujeto (por ejemplo, un mamífero), tal como un sujeto humano o un animal doméstico incluyendo, pero sin limitación, caballos (es decir, equinos), ganado, cabra, oveja, cerdo, perro, gato, camello, alpaca, llama y yak, que está diagnosticado con o que padece la patología y puede beneficiarse del trasplante de células estromales.

Como se menciona, las células pueden estar sin tratar o pueden modificarse genéticamente tal como para derivar una línea de interés (véase la Sol. de Pat. de Estados Unidos N.º 20030219423).

Las células pueden ser de preparaciones recientes o congeladas (por ejemplo, crio-conservadas).

Dependiendo de la afección médica, se pueden administrar al sujeto fármacos químicos adicionales (por ejemplo, inmunomoduladores, quimioterapia, etc.) o células.

Las células, aunque caracterizadas por la actividad inmunosupresora, pueden provocar aún una respuesta inmune

no deseada derivada del huésped o el donante. Se han desarrollado enfoques para reducir la probabilidad de rechazo de células no autólogas. Estos incluyen suprimir el sistema inmune del receptor o encapsular las células no autólogas en membranas semipermeables, inmunoaislantes antes del trasplante.

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

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

- 15 Por ejemplo, las microcápsulas se preparan formando complejos de colágeno modificado con una cubierta de terpolímero de metilacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), ácido metacrílico (MAA) y metacrilato de metilo (MMA), que da como resultado un espesor de cápsula 2-5 μm . Dichas microcápsulas pueden encapsularse adicionalmente con cubiertas de terpolímero de 2-5 μm adicionales para impartir una superficie uniforme cargada de forma negativa y para minimizar la absorción de proteínas en plasma (Chia, S.M. et al. Multi-layered microcapsules for cell encapsulation Biomaterials. 2002 23: 849-56).

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

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

Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero sin limitación, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxiclороquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE), etanercept, alfa bloqueantes de TNF, un agente biológico que dirige una citocina inflamatoria y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los ejemplos de AINE incluyen, pero sin limitación, ácido acetilsalicílico, salicilato de magnesio colina, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato sódico, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, cetorolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina, acetaminofeno, ibuprofeno, inhibidores de Cox-2 y tramadol.

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

Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de las células o medios acondicionados derivados de las mismas, con otros componentes químicos tales como vehículos o excipientes farmacéuticamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de las células a un sujeto.

En lo sucesivo en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa a un sujeto y no elimina la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. Los ejemplos, sin limitaciones, de vehículos son propilenglicol, solución salina, DMSO, HSA, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los ejemplos, sin limitación, de

excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

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

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la invención pueden formularse de este modo de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la ruta de administración elegida.

Para inyección, los principios activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tal como solución de Hank, solución de Ringer, tampón de sal fisiológica, o medio de congelación que contiene crioconservantes.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está también dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales.

Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una única administración o una pluralidad de administraciones. Sin embargo, la cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se trata, la gravedad de la afección, la manera de administración, el criterio del médico que prescribe, etc.

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

Las composiciones que incluyen la preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible pueden también prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y marcarse para el tratamiento de una afección indicada.

Las composiciones para el uso de la invención pueden presentarse, si se desea, en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o plástica, tal como un paquete de blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para administración. El paquete o dispensador puede alojarse también mediante un aviso asociado con el recipiente en la forma recetada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o venta de compuestos farmacéuticos, cuyo aviso es reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para fármacos de prescripción o de un prospecto de producto aprobado.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "incluyendo, pero sin limitación". Este término incluye los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

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

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de esta solicitud, diversas realizaciones de esta invención se pueden presentar en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6 tiene subintervalos descritos específicamente, tal como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como a los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

10 Siempre que se indique en el presente documento un intervalo numérico, se pretende que incluya cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado un número y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan indistintamente en el presente documento y pretenden incluir el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios e integrales entre los mismos.

15 Como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea determinada incluyendo, pero sin limitación, maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o fácilmente desarrollados, a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos por parte de profesionales de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

20 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

25 La palabra "ejemplar" se usa en el presente documento para referirse a "que sirve como un ejemplo, caso o ilustración". Cualquier realización descrita como "ejemplar" no debe interpretarse necesariamente como preferida o ventajosa sobre otras realizaciones y/o excluir la incorporación de características de otras realizaciones.

30 La palabra "opcionalmente" se usa en el presente documento para referirse a que "se proporciona en algunas realizaciones y no se proporciona en otras realizaciones". Cualquier realización particular de la invención puede incluir una pluralidad de características "opcionales" a menos que dichas características difieran.

35 Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuadas en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de estas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin estos elementos.

40 Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, como se han definido anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

45 Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitativa.

50 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías como se exponen en las Pat. de Estados Unidos N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994);

Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); se describen extensamente inmunoensayos disponibles en la patente y la bibliografía científica, véanse, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en el mismo se conocen bien en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

15 **EJEMPLO 1**

Recuperación y procesamiento de células adherentes de la placenta

Aislamiento de células estromales adherentes (ASC) - Se obtuvieron placentas humanas a término después de secciones de cesárea de madres donantes sanas después del consentimiento informado.

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

Crecimiento celular bidimensional (2D) - El primer pase se realizó típicamente después de 7-15 días. Comenzando en el pase 2 y continuando hasta el pase 6-8, las células se pasaron cuando el cultivo alcanzó el 70-90 % de confluencia, normalmente después de 4-5 días (1,5-2 duplicaciones). Las células se desprendieron de los matraces usando tripsina al 0,25 %-EDTA (4 minutos a 37 °C) y se sembraron en una densidad de cultivo de 4 ± 0,5 x 10³ células/cm². A lo largo del proceso, los cultivos se hicieron crecer en una incubadora de cultivo tisular en condiciones humidificadas con CO₂ al 5 % a 37 °C. Después de un total de 5-9 pases, las células se recogieron y se crioconservaron.

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

Para la congelación, las suspensiones celulares se diluyeron 1:1 con mezcla de congelación 2D (las concentraciones finales fueron DMSO al 10 %, FBS al 40 % y medio 2D al 50 %). Las células se almacenaron a una concentración final de 10 x 10⁶/ml en viales de polipropileno de crioconservación de 5 ml. Los viales se etiquetaron y se transfirieron a un congelador a velocidad controlada para un proceso de reducción de temperatura graduado (1 °C/min), después de lo cual se transfirieron a almacenamiento en fase gaseosa de un congelador de nitrógeno líquido.

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

EJEMPLO 2

Aislamiento y caracterización de fracciones de placenta

5

I. Aislamiento de células adherentes de diferentes porciones de placenta

Materiales y métodos

10 **Placenta** - Se obtuvieron placentas humanas a término después de cesáreas de fetos masculinos de madres donantes sanas después del consentimiento informado.

Aislamiento celular (para ilustración estructural véase la Figura 1)

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

20 **Aislamiento celular de la parte Decidua** - Esta etapa se realizó después de la eliminación de la membrana amniótica como se ha detallado anteriormente. La placenta se puso con el lado materno mirando hacia arriba. La decidua se diseccionó solo desde la región central de la superficie orientada al lado materno (véase la Figura 1). Se cortaron cuadrados de ~1 cm³ de profundidad de no más de 0,5 cm. Los pedazos se pusieron en una botella de 500 ml que contenía HBSS y se lavaron con HBSS.

25

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

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

35

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

40

Tabla 1 - Cariotipo

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

45 Los resultados demuestran claramente que las células derivadas de Decidua están enriquecidas por células

maternas (XX), mientras que las células derivadas de la vellosidad y la membrana amniótica están enriquecidas por células fetales (XY).

II. Caracterización de células adherentes de diferentes porciones de placenta

5

Morfología celular

La morfología y el tamaño (en diámetro) de las células obtenidas de las diferentes regiones de placenta como se ha descrito anteriormente se examinaron durante la expansión celular. Las células se cultivaron en DMEM (glucosa
10 baja) que incluía FBS al 8 % y se pasaron por cinco a siete duplicaciones de población. Las Figuras 2A-C muestran la morfología de células derivadas de la decidua basal, vellosidades coriónicas y membrana amniótica de la placenta. Se usó contraste de fase a una ampliación x 40 para todas las figuras. (A): La morfología de células adherentes derivadas de la decidua basal de placenta. (1): 8 días después del aislamiento (pase 0), (2): 13 días después del aislamiento (pase 1), (3): 20 días después del aislamiento (pase 2), (4): 24 días después del aislamiento
15 (pase 3). (B): La morfología de células adherentes derivadas del estroma vellosito de placenta. (1): 13 días después del aislamiento (pase 0), (2): 17 días después del aislamiento (pase 1), (3): 22 días después del aislamiento (pase 2), (4): 31 días después del aislamiento (pase 4). (C): La morfología de células adherentes derivadas de membrana amniótica de placenta. (1): 3 días después del aislamiento (pase 0), (2): 20 días después del aislamiento (pase 2),
20 (3): 29 días después del aislamiento (pase 3), (4): 41 días después del aislamiento (pase 5). Las micrografías de fase mostraron diferencia en la morfología de células derivadas de Decidua basal, vellosidad coriónica y membrana amniótica de placenta humana a término. Estos resultados son según las medidas de diámetro celular (como se describe a continuación).

Tamaño celular

25

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

30

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

Tasa de duplicación de población de las células

En cada pase las células se contaron y la tasa de duplicación de población al día se calculó según la ecuación 1:

Ecuación 1

40

Log (células viables totales en la cosecha/células viables totales en la siembra)/días de cultivo

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

45

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

50

Inmunofenotipo

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

55

Tabla 2- Anticuerpos

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

La Tabla 3 a continuación representa los resultados de la expresión de marcador.

5

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

Lote n.º	Fuente celular	Pase número	CD105	CD90	CD73	CD29	CD45	CD19	CD14	CD200
PO50809	Vellosidad	5	98,1	95,1	95,7	98,6	0,0	0,4	0,3	57,9
	Decidua	5	99,7	98,4	99,8	99,5	0,1	0,0	0,0	1,2
	Amnios	5	85,1	92,9	79,9	89,1	0,0	0,1	0,1	0,0
P190109	Vellosidad	5	99,43	99,9	99,6	99,7	0,1	0,1	0,0	60
	Decidua	5	99,65	99,4	99,5	99,4	0,0	0,0	0,0	0
	Amnios	5	98,3	99,6	99,3	99,6	0,1	0,1	0,0	44,5
P150609	Vellosidad	5	92,43	86,9	92,1	97,5	19,7	0,0	0,0	16,8
	Decidua	5	99,25	81,7	99,4	99,2	0,1	0,1	0,0	0,3
	Amnios	5	88,02	94,9	96,7	94,9	0,0	0,0	0,0	31,6
P290609	Vellosidad	5	99,6	90,8	98,4	94,6	0,0	0,1	0,2	17,8
	Decidua	5	99,5	94,4	99,3	97,9	0,0	0,0	0,1	1,1
	Amnios	5	98,0	92,0	97,3	91,6	0,3	0,1	0,0	13,0
PO70109	Vellosidad	5	96,06	99,9	96,1	99,1	0,0	0,1	0,0	57,8
	Decidua	5	99,24	99,3	98,7	99,4	0,2	0,0	0,0	3,5
	Amnios	4	86,8	87,0	83,7	82,0	0,6	0,0	0,3	8,6

Cabe apreciar que, las células derivadas de decidua mostraron muy baja expresión de CD200 en comparación con células derivadas de vellosidad y amnios.

10

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

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

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

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

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

EJEMPLO 3

30 **Propiedades angiogénicas *in vitro* de medios acondicionados derivados (CM) de las diversas porciones de placenta**

Procedimientos experimentales

Las células de placenta de las diversas fracciones se sembraron en una placa de 6 pocillos ($0,5 \times 10^6$ / pocillo) en 4 ml de medio DMEM complementado con FCS al 8 % durante 24 horas.

5

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

10

Se añadió CM derivado de placenta como se ha descrito anteriormente a HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) preparadas como se indica a continuación:

Se descongelaron 15.000 / células por pocillo y se sembraron en placas de 12 pocillos recubiertas con fibronectina con medio M-199 complementado con FCS al 20 % durante 24 horas. El medio se eliminó y se reemplazó con una mezcla del 50 % de BIO-MPM totalmente fresco {complementado con fungizona ($0,25 \mu\text{g/ml}$), gentamicina-IKA ($45 \mu\text{g/ml}$), ECGS (1 mg/ml), Heparina (5 U/ml) y glutamina (2 Mm) complementada con FCS al 10 %} y el 50 % de CM derivado de placenta fresco o congelado como se ha descrito anteriormente.

15

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

20 Los resultados mostrados en las Figuras 6A-C indican claramente que el CM obtenido de las tres porciones de placenta indujeron una elevación en la proliferación de HUVEC en comparación con medio similar no acondicionado BIO-MPM + medio de suero al 5 % e incluso en comparación con M199 + suero al 20 %, que es el medio de crecimiento estándar utilizado para la expansión de HUVEC.

25 EJEMPLO 4

Modelos in vivo para ensayar la eficacia terapéutica

I. Regeneración del músculo esquelético

30

La insuficiente regeneración de músculo esquelético post-traumática con eficiencia funcional consecutiva continúa siendo un grave problema en la cirugía ortopédica y traumática. Se han emprendido múltiples esfuerzos para transferir técnicas de ingeniería tisular para mejorar con éxito la regeneración del defecto muscular (Li y Huard 2002; Bach, Beier et al. 2004; Kamelger, Marksteiner et al. 2004; Peng y Huard 2004). La aplicación local de mioblastos en un defecto muscular mejora la regeneración, dando como resultado una mejora de fuerza de contracción de aproximadamente el 40 % (Arcila, Ameredes et al. 1997; Irintchev, Langer et al. 1997; Saxena, Marler et al. 1999; DeRosimo, Washabaugh et al. 2000). Sin embargo, la transferencia de este enfoque en la rutina clínica está limitada por la morbilidad del sitio donante. El trasplante de células precursoras del músculo autólogas ha mostrado resultados alentadores en el tratamiento del trauma muscular aunque está asociado con una morbilidad significativa del sitio donante (Huard, Cao et al. 2003; Deasy, Li et al. 2004; Peng y Huard 2004). El trasplante de células derivadas de médula ósea autólogas en un modelo de rata de trauma romo del músculo esquelético demostró su potencial para mejorar el resultado funcional después de una lesión de rotura del músculo esquelético (Matziolis, Winkler et al. 2006). No obstante, este enfoque padece las desventajas asociadas con el uso de una fuente autóloga de células y el malestar asociado con la aspiración de BM.

45

El potencial terapéutico de la población de células que se describe en el presente documento en la regeneración del músculo esquelético se evaluó en un modelo de rata de trauma romo del músculo esquelético como se describe por (Matziolis, Winkler et al. 2006).

50 Protocolo experimental

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

Tratamiento de las ratas: Aplastamiento del músculo sóleo.

55

Células: Células de placenta que crecieron en cultivo 3D como se describe en el documento WO2010/026575 [en lo sucesivo aquí "células PLX"].

Preparación de las células: Las células PLX criopreservadas se lavaron para eliminar el DMSO y la albúmina. Las células se suspendieron de nuevo en solución salina y se diluyeron a la concentración deseada (es decir, 5×10^6 en $40 \mu\text{l}$).

Inyección celular:

Inmediatamente después de la lesión (I)

1 semana después de la lesión muscular (DEL)

Dosis de células: $2,5 \times 10^6$.

5 Volumen de inyección: 20 μ l

Evaluación funcional del músculo: 3 semanas después del tratamiento

Biopsias: 3 semanas después del tratamiento

Trauma muscular

10

Los animales se anestesiaron, y la pata trasera inferior se afeitó (Favorita II, Aesculap, Tuttlingen, Alemania) y se desinfectó con povidona-yodo. A través de una incisión longitudinal posterolateral de 2 cm de la piel y por debajo de la fascia desde la cabeza del gastrocnemio lateral al tendón de Aquiles, el músculo sóleo se movilizó y se aplastó bruscamente. Para este propósito se usó una abrazadera curvada con puntas rodeada de tubos de polietileno para

15 evitar lesiones de la fascia muscular. El músculo se sujetó con abrazaderas manualmente siete veces su longitud completa con excepción del punto de entrada de las estructuras neurovasculares de suministro, que surgen de la parte media del gastrocnemio medio. Después de irrigaciones múltiples con solución salina, el músculo superficial y la piel se suturaron.

Medición de la resistencia muscular

Los animales se anestesiaron de nuevo. El nervio ciático y el músculo sóleo se expusieron de forma bilateral protegiendo todas las estructuras neurovasculares. En el lado tratado, así como en el lado no lesionado, el tendón de Aquiles se cortó y la extremidad inferior se fijó en el dispositivo de medición de fuerza muscular (Fish, McKee et al. 1989; Racz, Illyes et al. 1997) (Experimetria, Budapest, Hungría). La parte distal del músculo sóleo se conectó al

25 transductor de fuerza a través de una sutura (4-0, seda). Todos los músculos que se insertaron a través del tendón de Aquiles, excepto el músculo sóleo, se cortaron a través de la parte más cercana al tendón de Aquiles. El nervio ciático se estimuló posteriormente con 9 mA/75 Hz bipolar cinco veces, 0,1 s cada uno (8 periodos) con intervalos de 5 s entre los pulsos. Después de esta estimulación de contracción rápida, la resistencia máxima muscular se midió

30 usando un protocolo de estimulación de 9 mA/75 Hz durante cinco veces, 3 s cada una con intervalos de 5 s, alcanzado la tetania en todos los casos. Después de terminar las mediciones de resistencia muscular, los animales se sacrificaron. Las fuerzas de contracción bajo estimulación de contracción rápida ("FT") y tetánica ("TET") se compararon para cada músculo y se visualizaron en dos gráficos de dispersión (músculos lesionados y no lesionados). Todos los valores de fuerza se normalizaron de forma intra-individual frente a los músculos sóleo de

35 control derechos intactos.

Los resultados se muestran en la Figura 7.

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

40

El dolor neuropático crónico es común en la práctica clínica. Los pacientes con afecciones tan diversas como polineuropatía diabética, neuropatía sensorial por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), síndromes posteriores al ictus, isquemia y esclerosis múltiples, experimentan con frecuencia dolor diario que afecta en gran medida a su calidad de vida. La gestión del dolor crónico sigue siendo un reto a pesar de los números fármacos que están

45 aprobados o están aún en desarrollo. Aparte de alivio inadecuado, hay preocupaciones sobre efectos secundarios y adicción (Dworkin, Backonja et al. 2003). Durante la inflamación de tejidos periféricos, se producen numerosos mediadores mediante células endoteliales, células residentes y leucocitos que se reclutan al sitio de la lesión. Muchos de estos mediadores (por ejemplo, protones, citocinas y factor de crecimiento del nervio) se conocen por

50 provocar dolor mediante activación de neuronas aferentes primarias especializadas denominadas nociceptores (Rittner, Brack et al. 2008).

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

55 Protocolo experimental

Células - Células de placenta que crecieron en cultivo 3D como se describe en el documento WO2010/026575 [en lo sucesivo aquí "células PLX"]

Modelos animales

- 1- Modelo inflamatorio crónico: Adyuvante de Freund - Ratas con inflamación periférica inducida por inyección intraplantar de adyuvante de Freund completo (CFA). La administración de adyuvante de Freund completo (CFA) a roedores produce un estado parecido a enfermedad que se cree que es lo más parecido a la afección de artritis reumatoide humana, que se caracteriza por inflamación de la membrana que rodea las articulaciones, así como daño al hueso y al cartilago. Cuando se administra en la base de la cola, se desarrolla un estado poliartítico en ambas patas traseras durante varios días con signos máximos de inflamación, deterioro de las articulaciones e hiperalgesia que se produce a aproximadamente 3 semanas después de la administración. El estado poliartítico puede durar varias semanas (Cook y Nickerson 2005).
- 2- El dolor neuropático crónico de Bennett (ligadura parcial del nervio ciático, modelo de lesión por opresión crónica ("CCI")) como se describe por Labuz et al. 2009 (Labuz, Schmidt et al. 2009).

Evaluación del dolor

- El dolor se evaluó midiendo la hiperalgesia y antinocicepción mecánica y térmica. Los umbrales nociceptores mecánicos se evaluaron usando el algesiómetro de presión de la pata (prueba modificada de Randall-Selitto; Ugo Basile; Brack, Rittner et al. 2004; Rittner, Labuz et al. 2006). El día del ensayo, las ratas se dejaron sobre guata de papel, y se aplicó presión gradual a través de un pistón romo, con forma de cuña, sobre la superficie dorsal de la pata trasera mediante un calibrador automatizado. La presión necesaria que causa la retirada de la pata, el umbral de presión de la pata (PPT), se determinó mediante tres ensayos consecutivos separados en intervalos de 10 s. El mismo procedimiento se realizó en la pata contralateral; la secuencia de patas se alternó entre los sujetos para descartar efectos de orden. Los tratamientos se aleatorizaron, y el experimentador fue ciego al tratamiento. Una disminución en PPT se interpretó como hiperalgesia (dolor), mientras que un aumento en PPT se interpretó como antinocicepción (analgesia). Los umbrales nociceptivos térmicos se midieron por el ensayo de Hargreaves (Rittner, Mousa et al. 2006). Los animales se aclimataron al aparato de ensayo. Se aplicó calor radiante a la superficie plantar de una pata trasera desde debajo del suelo de cristal con una bombilla de alta intensidad, y la latencia de retirada de la pata (PWL) se midió con un temporizador electrónico (IITC Inc/Life Science, Woodland Hills, CA). La PWL fue el promedio de dos mediciones tomadas con intervalos de 20 s. La intensidad del estímulo se ajustó para dar PWL de 9 a 10 s en patas no inflamadas, y el corte fue en 20 s para evitar el daño del tejido. Una disminución en PWL se interpretó como hiperalgesia (dolor), mientras que un aumento en PWL se interpretó como antinocicepción (analgesia).

Resultados

1. Modelo del dolor inflamatorio (ratas)

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

Dos días después de la aplicación de CFA, a las ratas se les inyectó i.pl. como se indica a continuación:

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

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

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

2. Modelo de dolor neuropático (ratones)

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

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

5

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

10

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

15 A). Las células PLX no produjeron alteraciones en las patas contralaterales (Figuras 10B y 11B).

III. Nivel de péptido opiáceo endógeno en células PLX

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

20

Protocolo experimental

25 Las células se descongelaron, se centrifugaron para eliminar la disolución de crioconservación y se suspendieron de nuevo en DMEM de glucosa bajo libre de suero complementado con bestatina 130 µM, EDTA 1 mM y comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa Roche Cat. N.º 04 693 124 001 a una concentración final de 10×10^6 células PLX/250 µl.

30 La medición del contenido opiáceo se realizó en tres muestras de 10×10^6 células de cada lote de PLX.

Se añadieron 0,25 µl de una solución madre de ionomicina 10 mM (la concentración final es 10 µM) a la suspensión celular.

La suspensión celular se agitó durante 5 min a 600 rpm y 37 °C en un bloque de calentamiento.

35

La suspensión celular se centrifugó ($350 \times g/4$ °C) y los gránulos de células PLX y los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -20 °C hasta el momento del análisis.

Las cantidades de péptido opiáceo se determinaron usando kits EIA (Phoenix Laboratories, Inc. y Peninsula Laboratories) como se detalla a continuación de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Kits para la detección de péptidos opiáceos:

Encefalina-Metionina - Kit RIA (Peninsula Laboratories; # S-2119)

Encefalina-Leucina - Kit EIA fluorescente (Phoenix Laboratories Inc.; # FEK-024-21)

Dinorfina A - Kit EIA fluorescente (Phoenix; # FEK-021-03)

45

Endorfina, beta - Kit EIA fluorescente (Phoenix; # FEK-022-14)

Resultados

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

50

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

55

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

10 Protocolo experimental

Modelo de enfermedad - infarto de miocardio por ligadura LAD

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

Número total de ratones - 15

15

Distribución de ratones entre diferentes grupos experimentales

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

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

20

Grupo de *control* tardío (DÍA 28) (infarto, *solamente* vehículo) - 6

Dosificación de células/ratón - 1×10^6

Células/vial - 1×10^6

Anestesia usada - Ketamina-xilaxina

25 Procedimientos experimentales

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

Día 1 - 1ª ecocardiografía (los 3 grupos),

30

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

Día 7 - 2ª ecocardiografía (ambos grupos tardíos)

Día 14 - 3ª ecocardiografía (ambos grupos tardíos)

Día 21 - 4ª ecocardiografía (ambos grupos tardíos)

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

35

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

40 Perfil de marcador para inmunohistoquímica:

1. Antígeno nuclear humano (hNuc) - en la etapa temprana (día 3).

2. Cadena pesada de miosina cardíaca

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

Además, la mención o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se va a interpretar como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en que

50 se usan los encabezados de sección, no se interpretarán como limitantes necesariamente.

Lista de bibliografía

(se mencionan otras referencias en la solicitud)

55

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

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

- Bach, A. D., J. P. Beier, et al. (2004). "Skeletal muscle tissue engineering." *J Cell Mol Med* 8(4): 413-22.
- Bliss T., Guzman R., Daadi M. and Steinberg G.K., Cell transplantation therapy for stroke, *Stroke* 38 (2007) 817-826.
- 5 Brack, A., H. L. Rittner, et al. (2004). "Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells." *Pain* 112(3): 229-38.
- Chang C.J., Yen M.L., Chen Y.C., Chien C.C., Huang H.I., Bai C.H. and Yen B.L., Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma, *Stem Cells* 24 (2006) 2466-2477.
- 10 Chen J., Li Y., Katakowski M., Chen X., Wang L., Lu D., Lu M., Gautam S.C. and Chopp M., Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat, *J. Neurosci. Res.* 73 (2003) 778-786.
- Chen J., Sanberg P.R., Li Y., Wang L., Lu M., Willing A.E., Sanchez-Ramos J, and Chopp M., Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats, *Stroke* 32 (2001) 2682-2688.
- 15 Chopp M. and Li Y., Treatment of neural injury with marrow stromal cells, *Lancet Neurol.* 1 (2002) 92-100.
- Cook, C. D. and M. D. Nickerson (2005). "Nociceptive sensitivity and opioid antinociception and antihyperalgesia in Freund's adjuvant-induced arthritic male and female rats." *J Pharmacol Exp Ther* 313(1): 449-59.
- 20 Deasy, B. M., Y. Li, et al. (2004). "Tissue engineering with muscle-derived stem cells." *Curr Opin Biotechnol* 15(5): 419-23.
- DeRosimo, J. F., C. H. Washabaugh, et al. (2000). "Enhancement of adult muscle regeneration by primary myoblast transplantation." *Cell Transplant* 9(3): 369-77.
- Dong Y. and Benveniste E.N., Immune function of astrocytes, *Glia* 36 (2001) 180-190.
- 25 Dworkin, R. H., M. Backonja, et al. (2003). "Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations." *Arch Neurol* 60(11): 1524-34.
- Faulkner J.R., Herrmann J.E., Woo M.J., Tansey K.E., Doan N.B. and Sofroniew M.V., Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury, *J. Neurosci.* 24 (2004)2143-2155.
- Fish, J. S., N. H. McKee, et al. (1989). "Isometric contractile function recovery following tourniquet ischemia." *J Surg Res* 47(4): 365-70.
- 30 Gao Q., Li Y. and Chopp M., Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult, *Neuroscience* 136 (2005) 123-134.
- 35 Himeda T., Tounai H., Hayakawa N. and Araki T., Postischemic alterations of BDNF, NGF, HSP 70 and ubiquitin immunoreactivity in the gerbil hippocampus: pharmacological approach, *Cell Mol. Neurobiol.* 27 (2007) 229-250.
- Hu J., Ferreira A, and Van Eldik L.J., S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes, *J. Neurochem.* 69 (1997) 2294-2301.
- 40 Huard, J., B. Cao, et al. (2003). "Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration." *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(3): 230-7.
- Hum P.D., Subramanian S., Parker S.M., Afentoulis M.E., Kaler L.J., Vandenbark A.A. and Offner H., T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation, *J. Cereb. Blood Flow Metab* 27 (2007) 1798-1805.
- 45 In 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der K.C., de Groot-Swings G.M., Claas F.H., Fibbe W.E, and Kanhai H.H., Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta, *Stem Cells* 22 (2004) 1338-1345.
- Irintchev, A., M. Langer, et al. (1997). "Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts." *J Physiol* 500 (Pt 3): 775-85.
- 50 Jones B.J., Brooke G., Atkinson K. and McTaggart S.J., Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells, *Placenta* 28 (2007) 1174-1181.
- Kamelger, F. S., R. Marksteiner, et al. (2004). "A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model." *Biomaterials* 25(9): 1649-55.
- Kolk, M. V., D. Meyberg, et al. (2009). "LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction." *J Vis Exp*(32).
- 55 Kundrotiene J., Wagner A. and Liljequist S., Extradural compression of sensorimotor cortex: a useful model for studies on ischemic brain damage and neuroprotection, *J. Neurotrauma* 19 (2002) 69-84.
- Labuz, D., Y. Schmidt, et al. (2009). "Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice." *J Clin Invest* 119(2): 278-86.
- Le Blank K., Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells, *Cytotherapy.* 5 (2003) 485-489.

- Lee M.Y., Deller T., Kirsch M., Frotscher M. and Hofmann H.D., Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion, *J. Neurosci.* 17(1997) 1137-1146.
- 5 Li, Y. and J. Huard (2002). "Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle." *Am J Pathol* 161(3): 895-907.
- Li Y., Chen J., Chen X.G., Wang L., Gautam S.C., Xu Y.X., Katakowski M., Zhang L.J., Lu M., Janakiraman N. and Chopp M., Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery, *Neurology* 59 (2002) 514-523.
- 10 Liberto CM., Albrecht P.J., Herx L.M., Yong V.W. and Levison S.W., Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes, *J. Neurochem.* 89 (2004) 1092-1100.
- Marti H.H. and Risau W., Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95 (1998) 15809-15814.
- Matziolis, G., T. Winkler, et al. (2006). "Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats." *Tissue Eng* 12(2): 361-7.
- 15 Nishishita T., Ouchi K., Zhang X., Inoue M., Inazawa T., Yoshiura K., Kuwabara K., Nakaoka T., Watanabe N., Igura K., Takahashi T.A. and Yamashita N., A potential pro-angiogenic cell therapy with human placenta-derived mesenchymal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (2004) 24-31.
- Okawa H., Okuda O., Arai H., Sakuragawa N. and Sato K., Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain, *Neuroreport* 12 (2001) 4003-4007.
- 20 Peng, H. and J. Huard (2004). "Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair." *Transpl Immunol* 12(3-4): 311-9.
- Prather W.R., Toren A. and Meiron M., Placental-derived and expanded mesenchymal stromal cells (PLX-I) to enhance the engraftment of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 8 (2008) 1241-1250.
- 25 Prather W.R., Toren A., Meiron M., Ofir R., Tschope C. and Horwitz E.M., The role of placental-derived adherent stromal cell (PLX-PAD) in the treatment of critical limb ischemia, *Cytotherapy.* 11(4) (2009) 427-434.
- Racz, I. B., G. Illyes, et al. (1997). "The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle." *Eur Surg Res* 29(4): 254-63.
- 30 Rittner, H. L., A. Brack, et al. (2008). "Pain and the immune system." *Br J Anaesth* 101(1): 40-4.
- Rittner, H. L., D. Labuz, et al. (2006). "Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells." *FASEB J* 20(14): 2627-9.
- Rittner, H. L., S. A. Mousa, et al. (2006). "Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain." *J Leukoc Biol* 79(5): 1022-32.
- 35 Roelen D.L., van der Mast B.J., in't Anker P.S., Kleijburg C, Eikmans M., van B.E., de Groot-Swings G.M., Fibbe W.E., Kanhai H.H., Scherjon S.A. and Claas F.H., Differential immunomodulatory effects of fetal versus maternal multipotent stromal cells, *Hum. Immunol.* 70 (2009) 16-23.
- Saxena, A. K., J. Marler, et al. (1999). "Skeletal muscle tissue engineering using isolated myoblasts on synthetic biodegradable polymers: preliminary studies." *Tissue Eng* 5(6): 525-32
- 40 Schabitz W.R., Berger C, Kollmar R., Seitz M., Tanay E., Kiessling M., Schwab S. and Sommer C., Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia, *Stroke* 35 (2004) 992-997.
- Shen L.H., Li Y., Chen J., Zacharek A., Gao Q., Kapke A., Lu M., Raginski K., Vanguri P., Smith A. and Chopp M., Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke, *J. Cereb. Blood Flow Metab* 27 (2007) 6-13.
- 45 Silver J. and Miller J.H., Regeneration beyond the glial scar, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004) 146-156.
- Strachan R.D., Kane P.J., Cook S., Chambers I.R., Clayton C.B. and Mendelow A.D., Immunosuppression by whole-body irradiation and its effect on oedema in experimental cerebral ischaemia, *Acta Neurol. Scand.* 86 (1992) 256-259.
- 50 Tamura A., Graham D.I., McCulloch J. and Teasdale G.M., Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion, *J. Cereb. Blood Flow Metab* 1 (1981) 53-60.
- Toyama K., Honmou O., Harada K., Suzuki J., Houkin K., Hamada H. and Kocsis J.D., Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia, *Exp. Neurol.* 216 (2009) 47-55.
- 55 Trendelenburg G. and Dirnagl U., Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning, *Glia* 50 (2005) 307-320.
- Wei O.Y., Huang Y.L., Da CD. and Cheng J.S., Alteration of basic fibroblast growth factor expression in rat during cerebral ischemia, *Acta Pharmacol. Sin.* 21 (2000) 296-300.

Yen B.L., Huang H., Chien C.C., Jui H.Y., Ko B.S., Yao M., Shun C.T., Yen M.L., Lee M.X. and Chen Y.C., Isolation of multipotent cells from human term placenta, *Stem Cells* 23 (2005) 3-9.

5

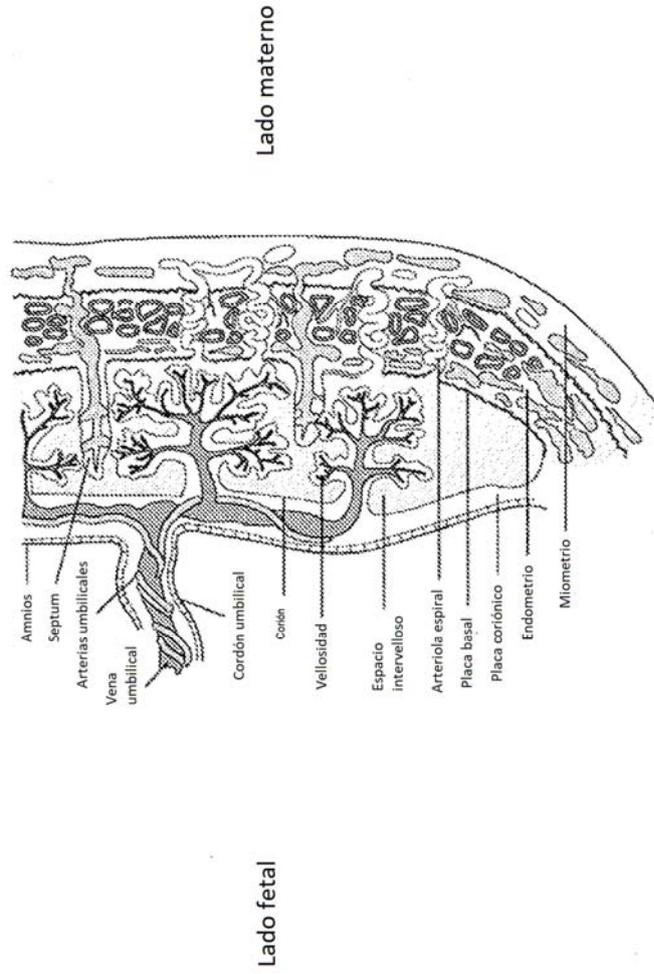
Zhao M.Z., Nonoguchi N., Ikeda N., Watanabe T., Furutama D., Miyazawa D., Funakoshi H., Kajimoto Y., Nakamura T., Dezawa M., Shibata M.A., Otsuki Y., Coffin R.S., Liu W.D., Kuroiwa T. and Miyatake S., Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector, *J. Cereb. Blood Flow Metab* 26 (2006) 1176-1188.

Zhu H., Mitsuhashi N., Klein A., Barsky L.W., Weinberg K., Barr M.L., Demetriou A. and Wu G.D., The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix, *Stem Cells* 24 (2006) 928-935.

10

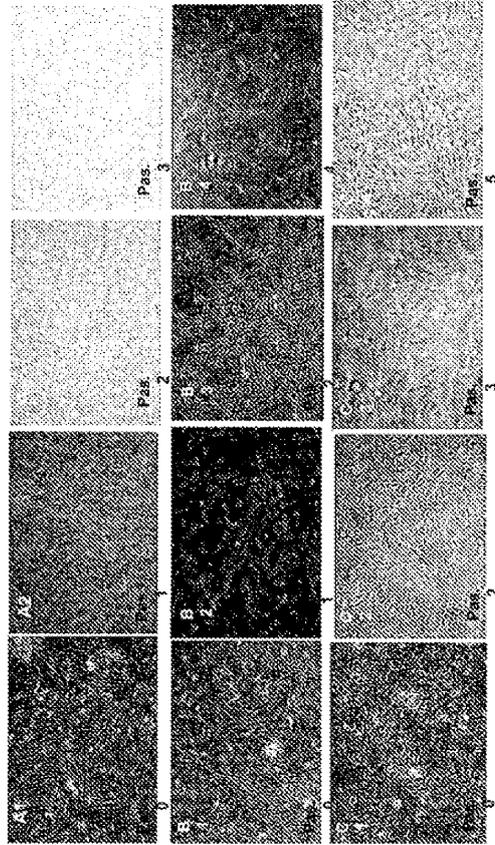
REIVINDICACIONES

1. Una población de células adherentes derivadas de la placenta que comprende al menos el 70 % de células adherentes de una porción fetal de la placenta para su uso en terapia, en donde las células son de una fuente alogénica o xenogénica.
5
2. La población de células adherentes para el uso de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.
- 10 3. La población de células adherentes para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dichas células adherentes expresan uno o más de CD73, CD90, CD29, CD105 o D7-fib.
4. La población de células adherentes para el uso de la reivindicación 3, en la que dichas células adherentes expresan todos los CD73, CD90, CD29 y CD105.
15
5. La población de células adherentes para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dichas células adherentes no expresan CD3, CD4, CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD 19, CD34, CD31, CD200, KDR, o CD79.
- 20 6. La población de células adherentes para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha porción fetal de la placenta comprende o consiste en amnios o vellosidades coriónicas.
7. La población de células adherentes para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dichas células adherentes expresan una o más de beta-endorfina, dinorfina A, leu-encefalina o met-encefalina.
25
8. La población de células adherentes para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dichas células adherentes se han cultivado en un cultivo tridimensional (3D).
9. La población de células adherentes para el uso de la reivindicación 8, en la que dicho cultivo
30 tridimensional (3D) comprende un biorreactor 3D.



Copyright ©2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc.
All rights reserved.

Fig. 1



Figs. 2A-C

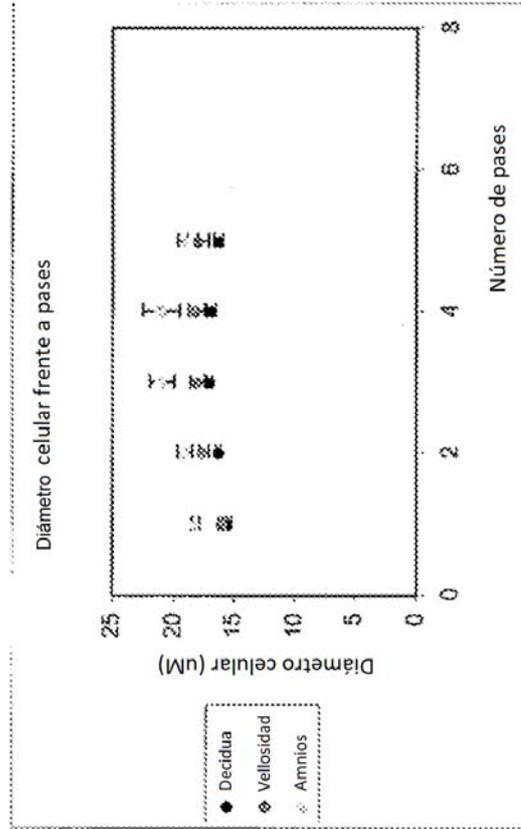


Fig. 3

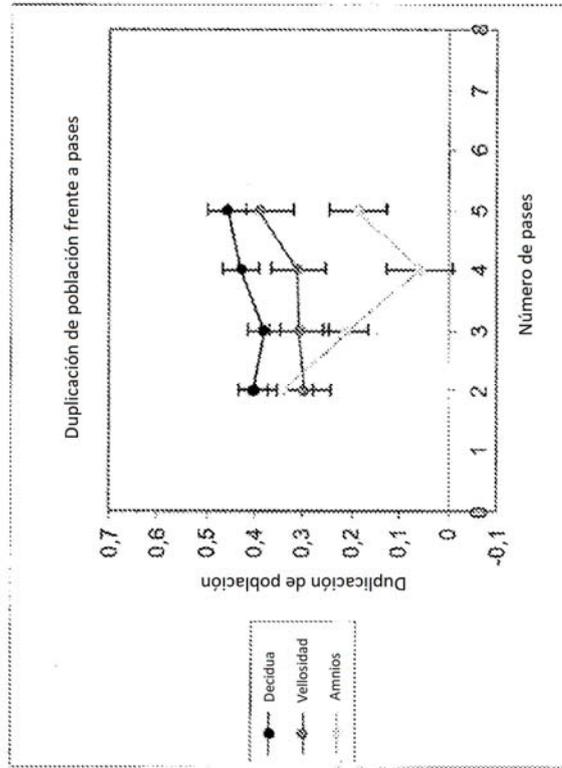


Fig. 4

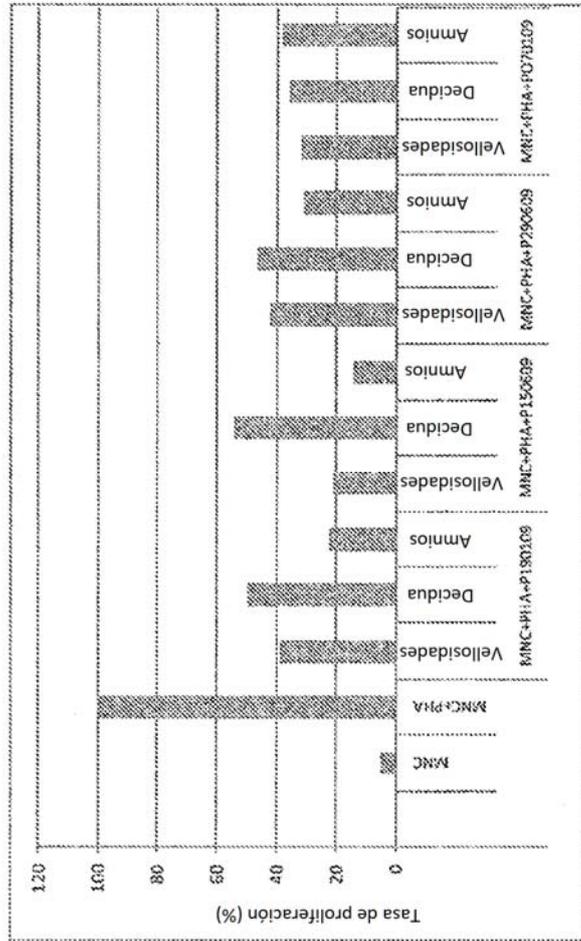


Fig. 5A

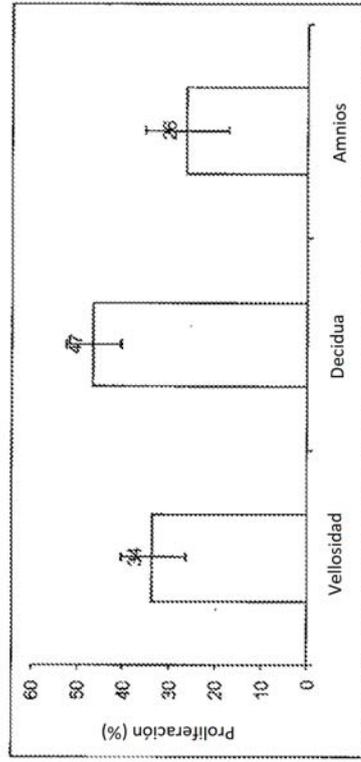
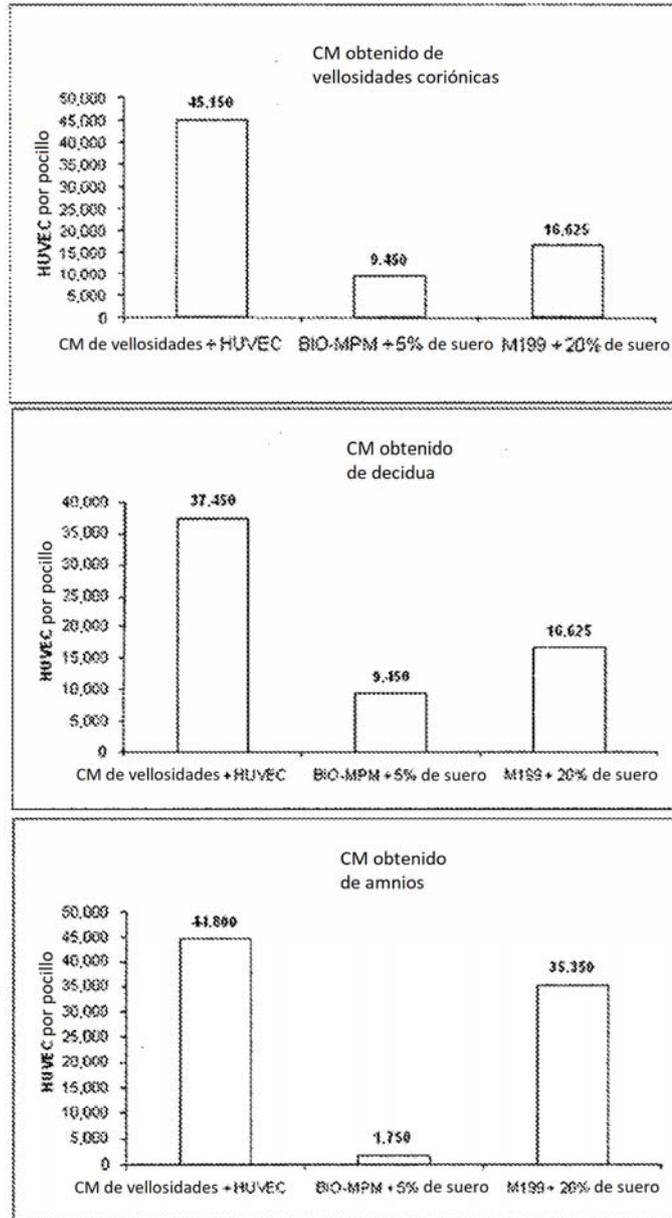


Fig. 5B



Figs. 6A-C

Fig. 7

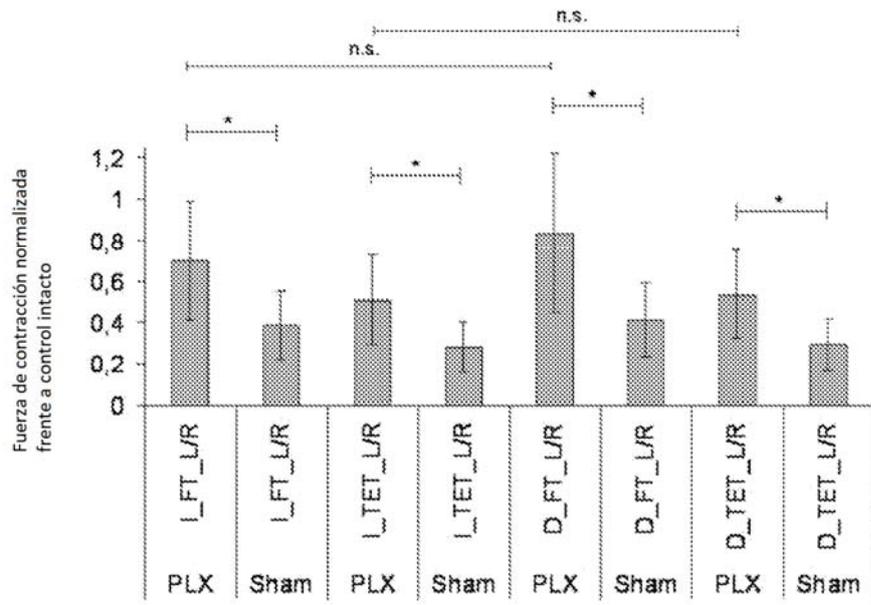


Fig. 8A

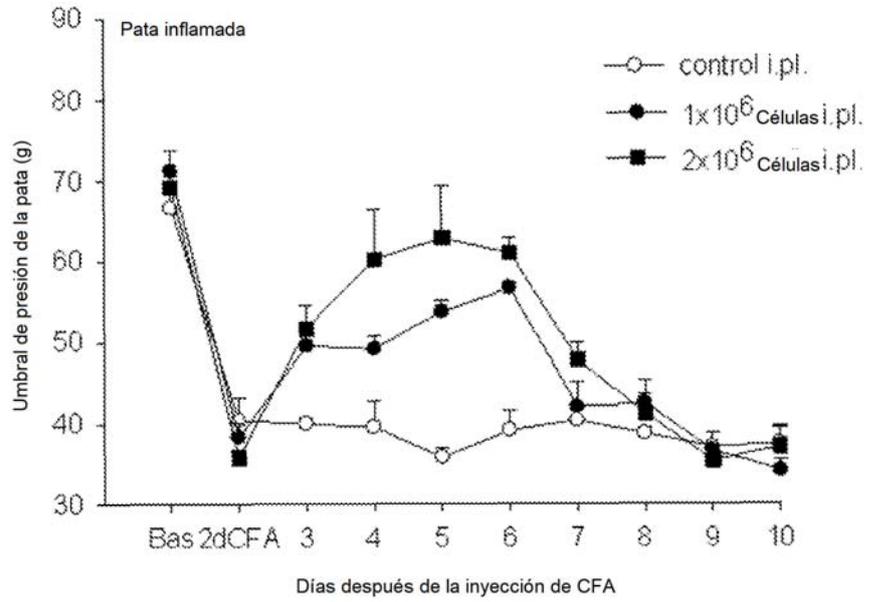


Fig. 8B

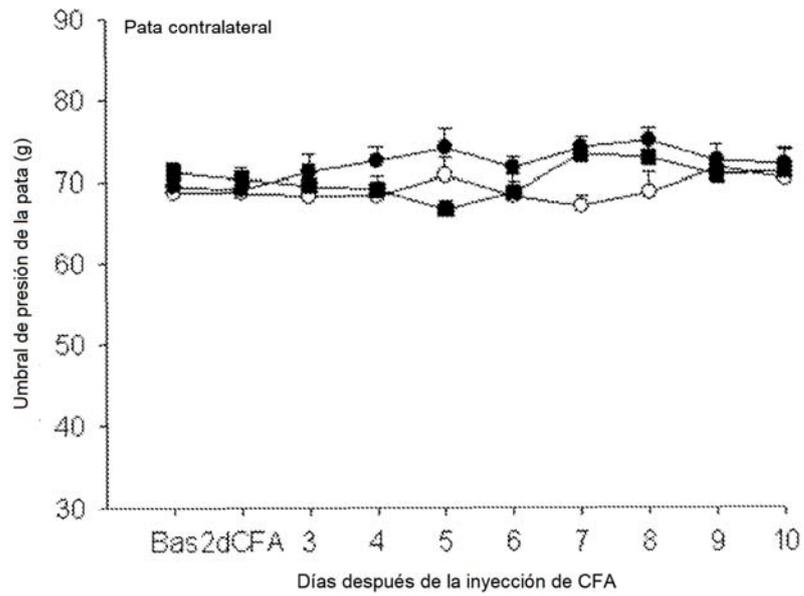


Fig. 9A

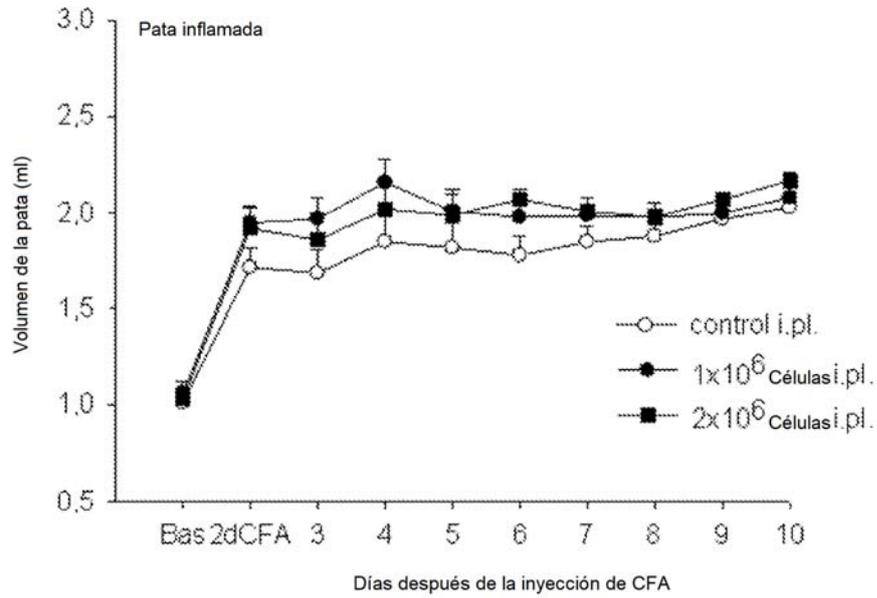


Fig. 9B

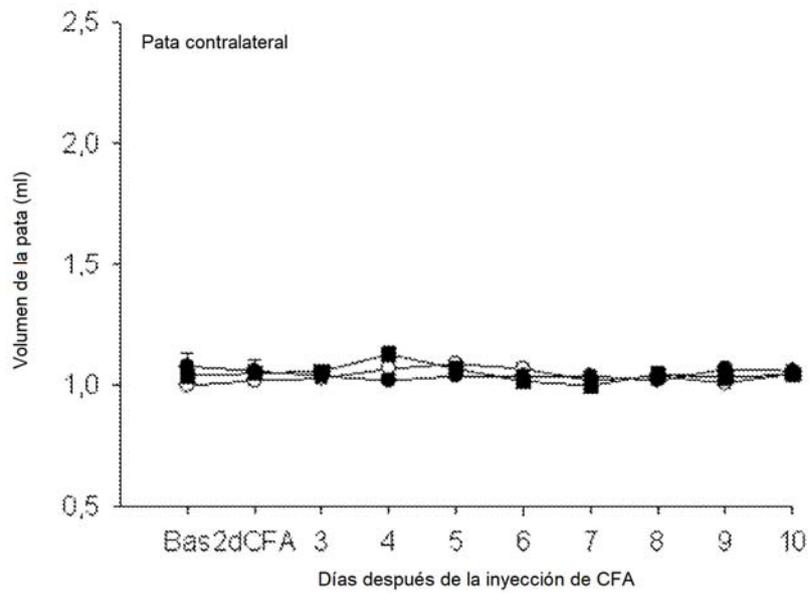


Fig. 10A

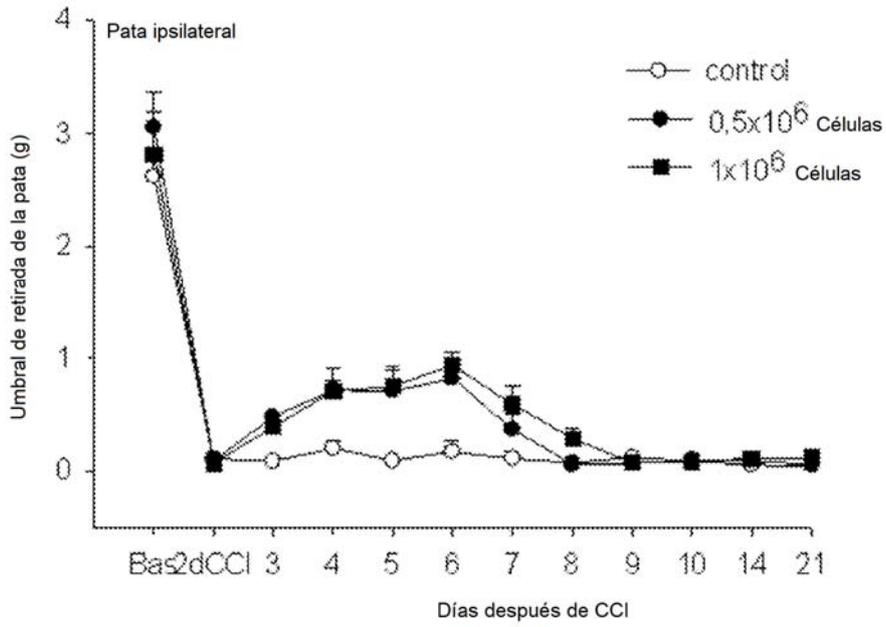


Fig. 10B

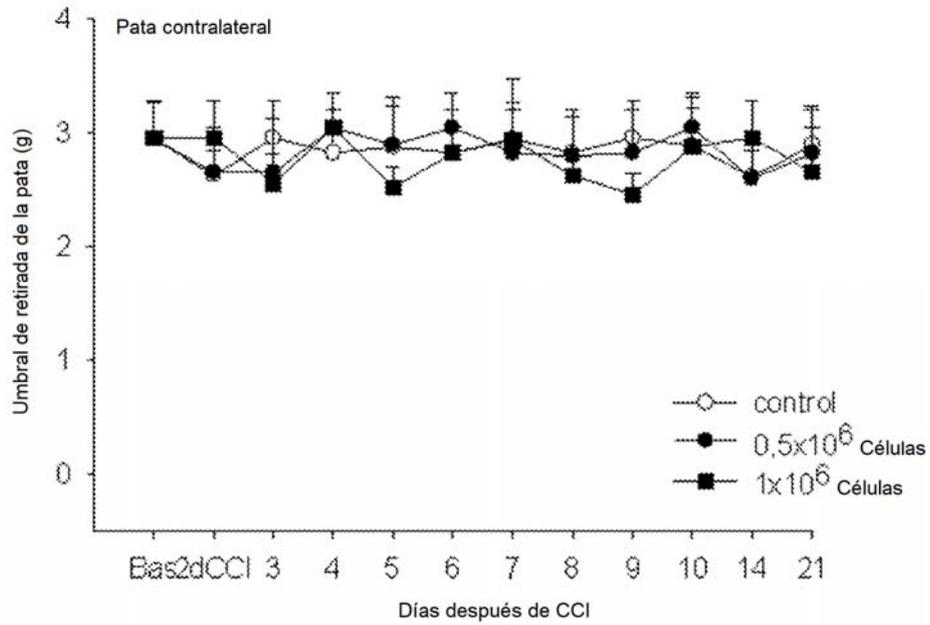


Fig. 11A

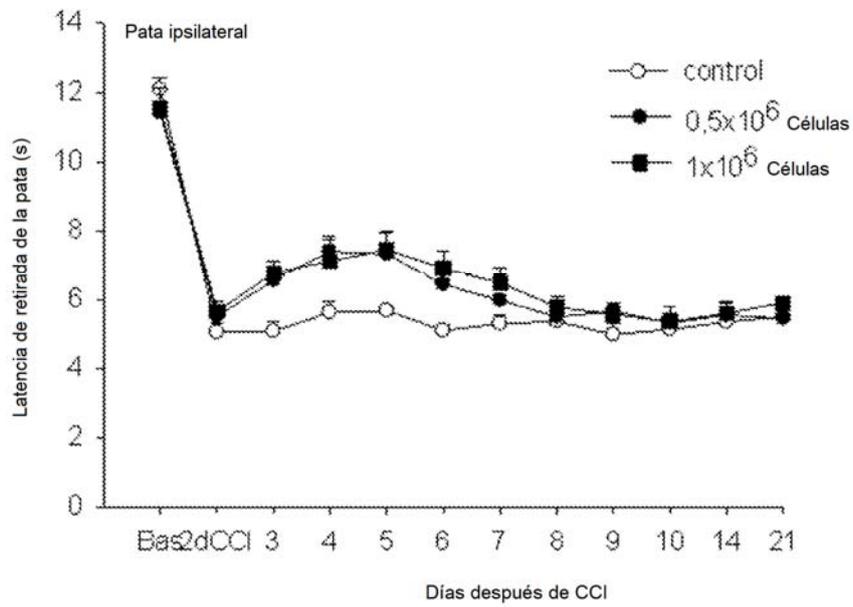


Fig. 11B

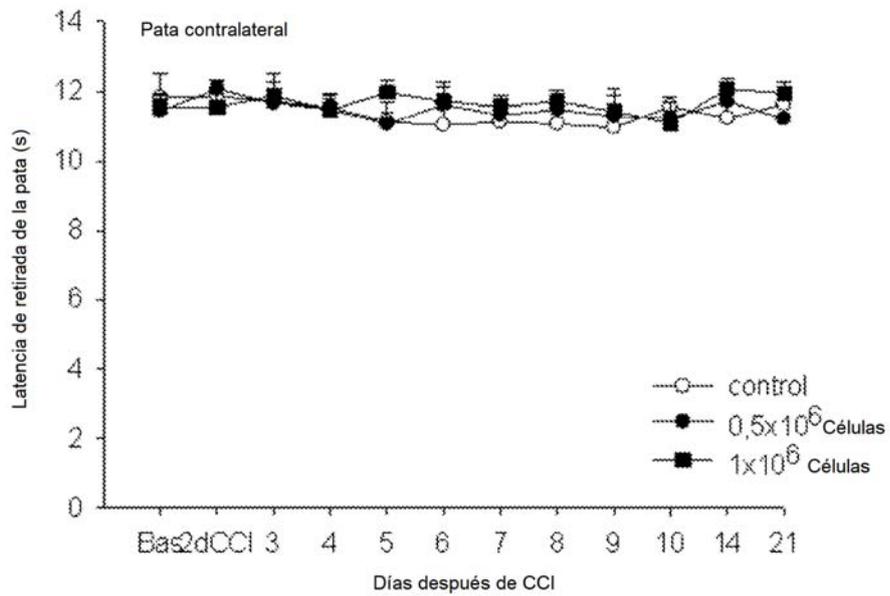


Fig. 12A

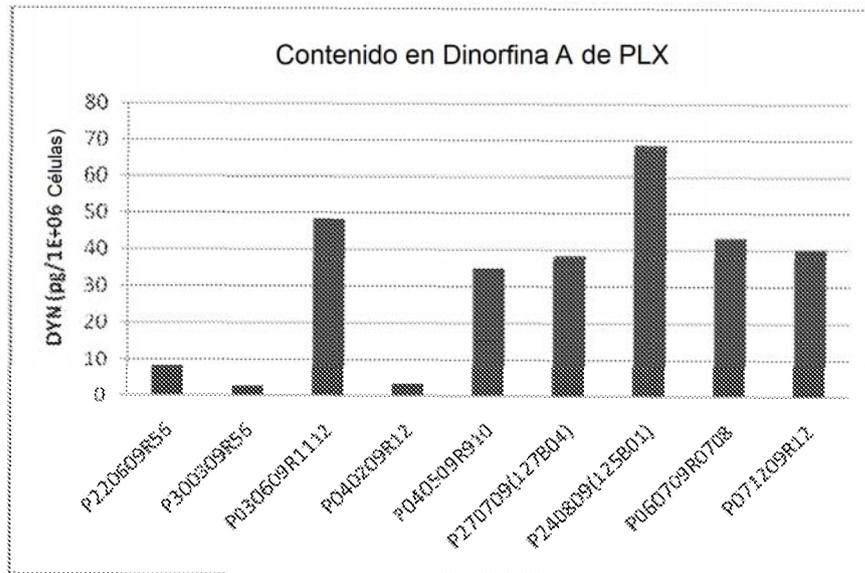


Fig. 12B

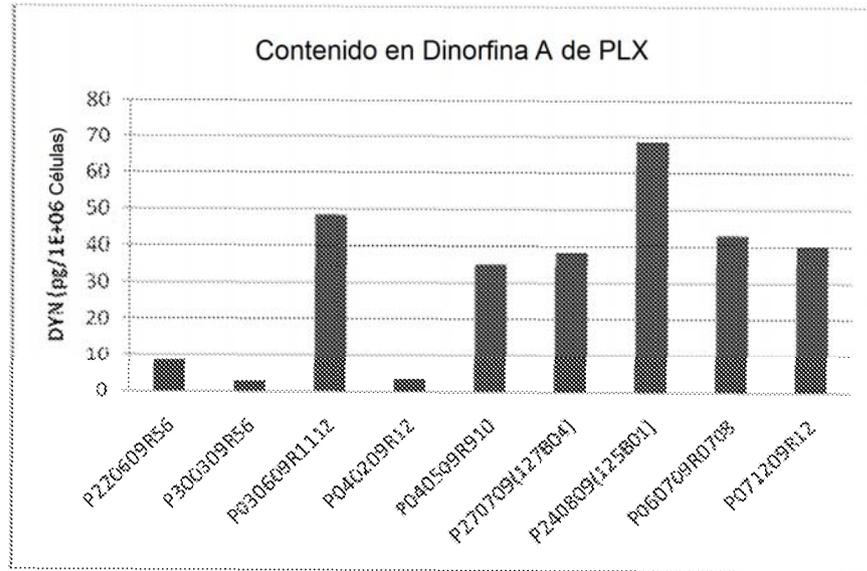


Fig. 12C

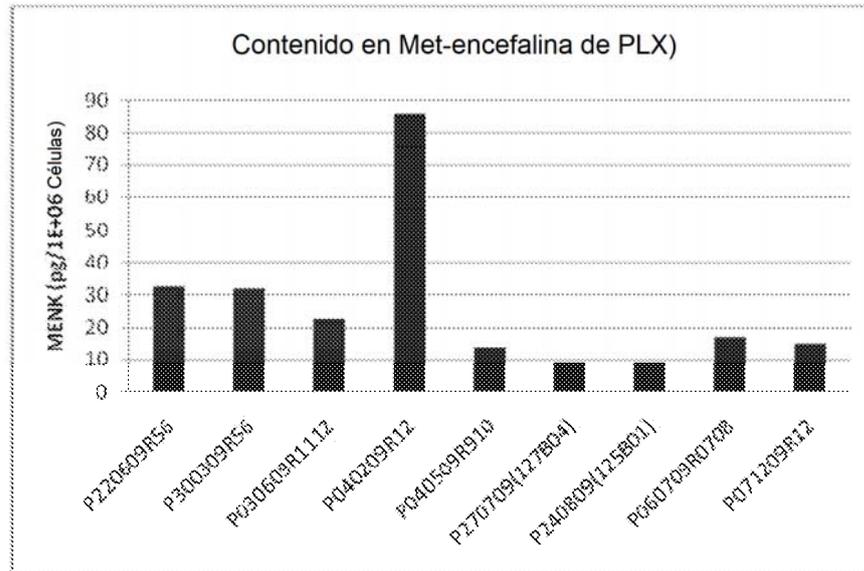


Fig. 12D

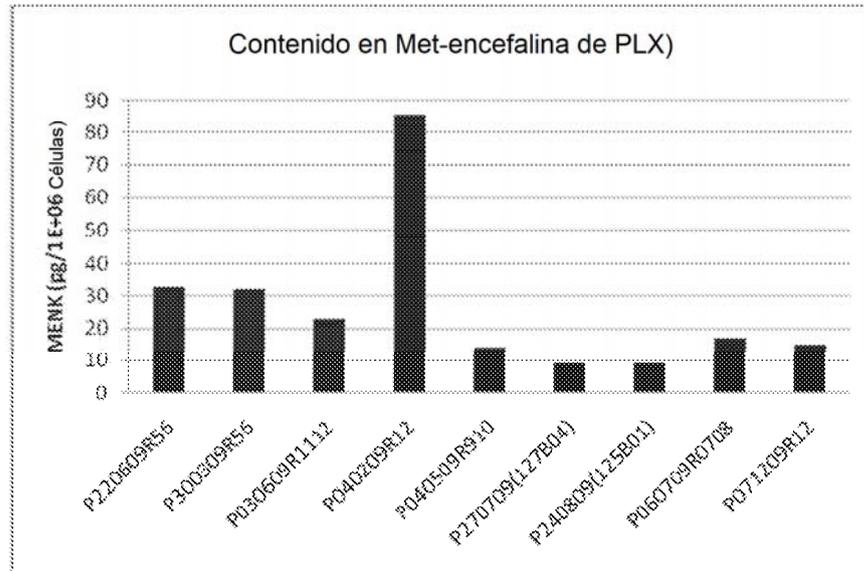


Fig. 12E

