

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 500**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2009 PCT/US2009/065152**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2010 WO10059828**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2009 E 09760674 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2367932**

54 Título: **Células adherentes derivadas del amnios**

30 Prioridad:

19.11.2008 US 116248 P

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

20.03.2020

73 Titular/es:

**CELULARITY, INC. (100.0%)
33 Technology Drive
Warren, NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**ABBOT, STEWART;
EDINGER, JAMES W.;
FRANCKI, ALEKSANDAR;
KAPLUNOVSKY, ALEKSANDR;
JANKOVIC, VLADIMIR;
LABAZZO, KRISTEN;
LAW, ERIC;
PADLIYA, NEERAV D.;
PAREDES, JENNIFER y
WANG, JIA-LUN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 749 500 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 derivadas del amnios

5 **1. Campo**

Se proporcionan en el presente documento novedosas poblaciones de células que comprenden células angiogénicas derivadas del amnios, denominadas en el presente documento "células adherentes derivadas del amnios" (AMDAC). Las células adherentes derivadas del amnios son distintas de las células madre placentarias anteriormente descritos, incluyendo las células madre placentarias con adherencia al plástico del cultivo de tejidos.

2. Antecedentes

Las composiciones de células, por ejemplo, composiciones de células madre, se han convertido en una terapia atractiva para numerosas deficiencias fisiológicas, por ejemplo, sustitución de la médula ósea. Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/122903 tiene la intención de describir poblaciones expandibles de células derivadas de fluido amniótico que se pueden diferenciar en un linaje de células β . Parolini Ornella et al.; STEM CELLS; Febrero de 2008; vol. 26, n.º 2, páginas 300-311; resume los resultados del primer International Workshop on Placenta Derived Stem Cells, que proporciona el estado actual de la investigación en este campo, abordando aspectos tales como los protocolos de aislamiento de células y las características de estas células. la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2008/213228 tiene la intención de describir métodos de utilizar células madre placentarias con adherencia y poblaciones de células madre placentarias, y métodos de cultivo, proliferación, expansión, y diferenciación de los mismos. El documento WO 2007/136673 tiene la intención de describir métodos y composiciones para tratar el dolor de la parte inferior de la espalda administrando una cantidad eficaz de uno o más tipos de células, solas y/o en combinación con una matriz. Alviano Francesco et al.; BMC Developmental Biology; Febrero de 21,2007; vol. 7, n.º 1, página 11; tiene la intención de describir la investigación en términos de membrana amniótica (AM) como una fuente abundante de hMSC. La investigación estableció que la recuperación de las hMSC y su potencial expansión *in vitro* fue mayor en la membrana amniótica que en el estroma de la médula ósea. Nishishita Toshihide et al.; Biochemical and Biophysical Research Communications; 3 de diciembre de 2004; vol. 325, n.º 1, páginas 24-31; tiene la intención de describir una potencial terapia con células proangiogénicas para tratar las enfermedades isquémicas humanas con células mesenquimales derivadas de placenta humana (hPDMC). Existe una necesidad de poblaciones adicionales de células, por ejemplo, células madre o células progenitoras que tienen potencial y/o propiedades angiogénicas.

Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/122903 tiene la intención de describir poblaciones expandibles de células derivadas de fluido amniótico que se pueden diferenciar en un linaje de células β . Parolini Ornella et al.; STEM CELLS; Febrero de 2008; vol. 26, n.º 2, páginas 300-311; resume los resultados del primer International Workshop on Placenta Derived Stem Cells, que proporciona el estado actual de la investigación en este campo, abordando aspectos tales como los protocolos de aislamiento de células y las características de estas células. la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2008/213228 tiene la intención de describir métodos de utilizar células madre placentarias con adherencia y poblaciones de células madre placentarias, y métodos de cultivo, proliferación, expansión, y diferenciación de los mismos. El documento WO 2007/136673 tiene la intención de describir métodos y composiciones para tratar el dolor de la parte inferior de la espalda administrando una cantidad eficaz de uno o más tipos de células, solas y/o en combinación con una matriz. Alviano Francesco et al.; BMC Developmental Biology; 21 de febrero de 2007; vol. 7, n.º 1, página 11; tiene la intención de describir la investigación en términos de membrana amniótica (AM) como una fuente abundante de hMSC. La investigación estableció que la recuperación de las hMSC y su potencial expansión *in vitro* fue mayor en la membrana amniótica que en el estroma de la médula ósea. Nishishita Toshihide et al.; Biochemical and Biophysical Research Communications; viernes, 3 de diciembre de 2004; vol. 325, n.º 1, páginas 24-31; tiene la intención de describir una potencial terapia con células proangiogénicas para tratar las enfermedades isquémicas humanas con células mesenquimales derivadas de placenta humana (hPDMC).

3. Sumario

En un aspecto, La presente invención proporciona una población aislada de células, en la que al menos un 50 % de las células son células adherentes derivadas del amnios, en la que dichas células adherentes derivadas del amnios se adhieren al plástico del cultivo de tejidos, y en la que las células adherentes derivadas del amnios son OCT-4⁻ (proteína 4 de unión a octámero) como se determina mediante la RT-PCR y CD49⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻ y HLA-G⁻ como se determina mediante citometría de flujo.

En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios son VEGFR1/Flt-1⁺ (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular) y VEGFR2/KDR⁺ (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular) como se determina mediante inmunolocalización.

En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios son una o de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺ (receptor de la angiopoyetina), TEM-7⁺ (marcador 7 endotelial tumoral), CD31⁺, CD34⁺, CD45⁺,

CD133⁻, CD143⁻ (enzima convertidora de la angiotensina-1, ACE), CD146⁻ (molécula de adhesión celular a melanoma), o CXCR4⁻ (receptor 4 de la quimioquina (motivo C-X-C)) como se determina mediante inmunolocalización.

5 En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios son CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺ (receptor de la angiopoyetina), TEM-7⁺ (marcador 7 endotelial tumoral), CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, y CXCR4⁻ como se determina mediante inmunolocalización.

10 En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios son VE-caderina⁻ como se determina mediante inmunolocalización.

En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios son adicionalmente positivas para CD200⁺ como se determina mediante inmunolocalización.

15 En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios no expresan CD34 como es detectable mediante inmunolocalización tras exposición a 50 ng/ml de VEGF durante 7 días.

En determinadas realizaciones, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % de las células en dicha población son células adherentes derivadas del amnios.

20 En determinadas realizaciones, la población aislada de células comprende un segundo tipo de célula, en la que dicho segundo tipo de célula es, una célula de la sangre, una célula madre aislada de tejido periférico, una célula madre aislada de sangre placentaria, una célula madre aislada de perfusato placentario, una célula madre aislada de tejido placentario, una célula madre aislada de sangre de cordón umbilical, una célula madre del cordón umbilical, una célula madre mesenquimal derivado de médula ósea, una célula del estroma mesenquimal derivada de médula ósea, una
25 célula madre hematopoyética, una célula madre somática, un condrocito, un fibroblasto, una célula muscular, una célula endotelial, un angioblasto, una célula precursora endotelial, un pericito, un cardiomiocito, un miocito, un cardiomioblasto, un mioblasto.

30 En determinadas realizaciones, dicho segundo tipo de célula comprende al menos un 10 % de las células en dicha población o al menos un 25 % de las células en dicha población.

En determinadas realizaciones, dicho segundo tipo de célula es una célula madre hematopoyética o una célula precursora.

35 En determinadas realizaciones, dicha célula madre hematopoyética o célula precursora es una célula CD34⁺.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una matriz o estructura principal descelularizada o sintética permanente o degradable que comprende la población de células de la presente invención.

40 En determinadas realizaciones, dicha matriz o estructura principal es una membrana amniótica; una matriz extracelular deshidratada; colágeno placentario, o membrana extracelular placentaria.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una población aislada de células de la presente invención, para su uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio en un individuo.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una población aislada de células de la presente invención, para su uso en un método para tratar un individuo que tiene una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor del SNC.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una población aislada de células de la presente invención, para su uso en un método para tratar un individuo que tiene una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor de una extremidad.

55 Finalmente, la presente invención proporciona el uso de la población de células de la presente invención en la fabricación de una composición para tratar un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, en el que dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad o un trastorno del sistema circulatorio, una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor del SNC, o una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor de una extremidad.

60 A partir de ahora en el presente documento, se hace referencia a una/la población aislada de células en el contexto de la invención y sus realizaciones significan la población aislada de células como se ha definido anteriormente.

65 En un aspecto, se proporciona en el presente documento una población aislada de células que comprende al menos un 50 % de células adherentes derivadas del amnios, denominada también en el presente documento AMDAC. Dicha célula se adhiere al plástico del cultivo de tejidos, y en el que dicha célula es OCT-4⁻ (negativa para OCT-4, conocida también como POU5F1 o proteína 4 de unión a octámero), como se determina mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), por ejemplo, como se comparó con una línea de células del control adecuada, tal como un línea de células madre derivada de carcinoma embrionario (por ejemplo, NTERA-2, por ejemplo,

disponible de la American Type Culture Collection, ATCC Número CRL-1973), durante 30 ciclos. Además, dicha célula AMDAC de la invención es CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻ y HLA-G⁻, como se determina mediante citometría de flujo. A partir de ahora en el presente documento, la célula AMDAC como se ha definido anteriormente se denomina célula AMDAC de la invención. En una realización específica, las células AMDAC de la invención son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y adicionalmente VEGFR1/Flt-1⁺ (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular) y VEGFR2/KDR⁺ (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular) conocido también como receptor del dominio de inserción de la quinasa), como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, las células AMDAC de la invención son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y CD49f⁺ (integrina- $\alpha 6^+$), como se determina mediante la inmunolocalización de HLA-G⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻ como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, la célula AMDAC de la invención es OCT-4⁻, y no expresa SOX2, por ejemplo, como se determina mediante la RT-PCR durante 30 ciclos.

En otra realización, dicha célula AMDAC de la invención es una o más de CD29⁺, CD73⁺, ABC-p⁺, y CD38⁻, como se determina mediante inmunolocalización.

En otra realización específica, la célula AMDAC de la invención es adicionalmente una o más de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺ (receptor de la angiopoyetina), TEM-7⁺ (marcador 7 endotelial tumoral), CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143 (enzima convertidora de la angiotensina-1, ACE), CD146⁻ (molécula de adhesión celular a melanoma), CXCR4⁻ (receptor 4 de la quimioquina (motivo C-X-C)) como se determina mediante inmunolocalización. En una realización más específica, dicha célula es CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, y CXCR4⁻ como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización más específica, la célula adherente derivada del amnios proporcionada en el presente documento es OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR; y adicionalmente VEGFR1/Flt-1⁺ y/o VEGFR2/KDR⁺, como se determina mediante inmunolocalización; y una o más, o todas, de CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, y/o Tie-2⁻ como se determina mediante inmunolocalización. En una realización específica, la célula adherente derivada del amnios, o una población de células adherentes derivadas del amnios, expresan al menos 2 unidades logarítmicas menos que el ARNm amplificado mediante la PCR para OCT-4 en, por ejemplo, > de 20 ciclos, que una célula NTERA-2, o una población de células NTERA-2 que tienen un número equivalente de células. En otra realización específica, la célula AMDAC de la invención es adicionalmente VE-caderina⁻ (CD144⁻) como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, dicha célula AMDAC de la invención es positiva para CD105⁺ y CD200⁺ como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, dicha célula AMDAC de la invención no expresa CD34 como se detecta mediante inmunolocalización tras exposición de 1 a 100 ng/ml de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) durante 4 a 21 días.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una célula adherente aislada derivada del amnios, en la que dicha célula se adhiere al plástico del cultivo de tejidos, y en la que dicha célula es OCT-4⁻ y SOX-2⁻, como se determina mediante la RT-PCR; y CD49f⁺ CD90⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ y CD117⁻, como se determina mediante citometría de flujo. En realizaciones específicas, la célula OCT-4⁻; SOX-2⁻ es adicionalmente CD271⁺; como se determina mediante citometría de flujo. En una realización más específica, dicha célula es OCT-4⁻ y SOX-2⁻, como se determina mediante la RT-PCR; y CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻, CD271⁺ y HLA-G⁻, como se determina mediante la citometría de flujo de la invención.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una célula adherente aislada derivada del amnios de la invención, en la que dicha célula se adhiere al plástico del cultivo de tejidos, y en el que dicha célula es adicionalmente positiva para CD309 (conocida también como VEGFR2/KDR⁺).

En otro aspecto, Se divulga en el presente documento una célula adherente derivada del amnios, en la que dicha célula se adhiere al plástico del cultivo de tejidos, y en la que dicha célula es OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y una o más de como se determina mediante la RT-PCR, y una o más de VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁺, o VE-caderina⁻, como se determina mediante inmunolocalización. En otro aspecto, dicha célula es OCT-4⁻; como se determina mediante la RT-PCR a, por ejemplo, >20 ciclos, y VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁺, y VE-caderina⁻; como se determina mediante inmunolocalización. En otro aspecto, la célula no expresa CD34, como se detecta mediante inmunolocalización, tras la exposición de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días.

En una realización, la célula adherente derivada del amnios es OCT-4⁻; CD49f⁺, HLA-G⁻, CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻. En una realización más específica, dicha célula es adicionalmente una o más de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻ (molécula de adhesión celular a melanoma), o CXCR4⁻, como se determina mediante inmunolocalización o citometría de flujo. En una realización más específica, dicha célula es adicionalmente CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, y CXCR4⁻ como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, dicha célula es adicionalmente VEGFR1/Flt-1⁺ y/o VEGFR2/KDR⁺, como se determina mediante inmunolocalización; y una o más de CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, y/o Tie-2⁻ como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, dicha célula es adicionalmente VEGFR1/Flt-1⁺, VEGFR2/KDR⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, y Tie-2⁻ como se determina mediante inmunolocalización.

En otra realización, se proporciona en el presente documento una célula adherente aislada derivada del amnios, en la que dicha célula no expresa el ARNm para FGF4, IFNG, CXCL10, ANGPT4, ANGPTL3, FGA, LEP, PRL, PROK1, TNMD, FLT3, XLKD1, CDH5, LECT1, PLG, *TERT*, SOX2, NANOG, MMP-13, DLX5, o BGLAP, como se determina mediante la RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos. En otra realización, se proporciona en el presente documento

5 una célula adherente aislada derivada del amnios, en la que dicha célula no expresa constitutivamente una o más de la cadena invariante, HLA-DR-DP-DQ, CD6, CD271, como se determina mediante citometría de flujo.

Se proporciona además en el presente documento una población aislada de células que comprende al menos un 50 % de células adherentes derivadas de amnios de la presente invención. En una realización específica, al menos

10 aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de células en dicha población son células adherentes derivadas del amnios de la presente invención. En una realización, dicha célula AMDAC de la invención es OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR y VEGFR1/Flt-1⁺ y/o VEGFR2/KDR⁺ como se determina mediante inmunolocalización, y en la que dicha población aislada de células no es un amnios. En otra realización, se proporciona en el presente documento una población aislada de células que comprende una célula adherente derivada del amnios

15 de la invención, que adicionalmente es VEGFR1/Flt-1⁺ o VEGFR2/KDR⁺ como se determina mediante inmunolocalización; y en la que dicha población aislada de células no es un amnios. En una realización específica, al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de células en dicha población son las mencionadas células adherentes derivadas del amnios. En otra realización, se proporciona en el presente documento una población aislada de células que comprende una célula adherente derivada del amnios de la invención, en la que dicha célula se adhiere al plástico del cultivo de tejidos, en la que dicha célula es adicionalmente VEGFR1/Flt-1⁺ y VEGFR2/KDR⁺ como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización, dicha célula AMDAC de la invención es una o más de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, o CXCR4⁻, como se determina mediante inmunolocalización. En otro aspecto, la célula es HLA-G⁻ como se determina mediante la RT-PCR para, por ejemplo, >20 ciclos, y en la que dicha población aislada de células

20 no es un amnios. En una realización específica, al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de células en dicha población son células adherentes derivadas del amnios de la invención. En otra realización, se proporciona en el presente documento una población aislada de células que comprende una célula adherente derivada del amnios de la invención, en la que dicha célula se adhiere al plástico del cultivo de tejidos, en la que dicha célula es OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y adicionalmente EGFR1/Flt-1⁺ y/o VEGFR2/KDR⁺ como se determina mediante inmunolocalización, en la que dicha célula no expresa CD34 como se detecta mediante inmunolocalización tras la exposición de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días, y en la que dicha población de células aisladas no es un amnios. En una realización específica, al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de células en dicha población son las mencionadas células adherentes derivadas del amnios de la invención. En otra realización, cualquiera de las anteriores poblaciones de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios forman brotes o estructuras similares a tubos cuando se cultivan en presencia de factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), por ejemplo, en un sustrato tal como MATRIGEL™.

25 30 35

En otra realización, se proporciona en el presente documento una población de células, en la que al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de células en dicha población son células adherentes derivadas del amnios de la invención que son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y adicionalmente para VEGFR2/KDR, CD9, CD54, CD105 o CD200. En una realización específica, al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de células en dicha población aislada son células adherentes derivadas del amnios que son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, y CD200⁺, como se determina mediante inmunolocalización. En una realización más específica, dichas células adherentes derivadas del amnios no expresan CD34, como se detecta mediante inmunolocalización, tras la exposición de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En una realización específica, dichas células adherentes derivadas del amnios se adhieren al plástico del cultivo de tejidos. En otra realización específica, dicha población de células forma brotes o estructuras similares a tubos cuando se cultivan en presencia de un factor angiogénico tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), por ejemplo, en un sustrato tal como MATRIGEL™.

40 45 50

En otra realización, se proporciona en el presente documento una población de células, por ejemplo, células humanas, en la que al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de células en dicha población de células son células adherentes derivadas del amnios de la invención que expresan el ARN para uno o más, o todos, de ACTA2, ADAMTS1, AMOT, ANG, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL1, ANGPTL2, ANGPTL4, BAI1, CD44, CD200, CEACAM1, CHGA, COL15A1, COL18A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, CSF3, CTGF, CXCL12, CXCL2, DNMT3B, ECGF1, EDG1, EDIL3, ENPP2, EPHB2, FBLN5, F2, FGF1, FGF2, FIGF, FLT4, FN1, FST, FOXC2, GRN, HGF, HEY1, HSPG2, IFNB1, IL8, IL12A, ITGA4, ITGAV, ITGB3, MDK, MMP2, MYOZ2, NRP1, NRP2, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PECAM1, PF4, PGK1, PROX1, PTN, SEMA3F, SERPINB5, SERPINC1, SERPINF1, TIMP2, TIMP3, TGFA, TGFB1, THBS1, THBS2, TIE1, TIE2/TEK, TNF, TNNI1, TNFSF15, VASH1, VEGF, VEGFB, VEGFC, VEGFR1/FLT1, o VEGFR2/KDR.

55 60

En otra realización, se proporciona en el presente documento una población de células, en la que al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de células en dicha población aislada de células

65

son células adherentes derivadas del amnios de la invención que expresan uno o más de, o todos de, CD49d, Conexina-43, HLA-ABC, Beta 2-microglobulina, CD349, CD318, PDL1, CD106, Galectina-1, el precursor de ADAM 17 (Una desintegrina y el dominio 17 de la metaloproteínasa) (la enzima convertidora de TNF-alfa) (TNF-alfa convertasa), El precursor del angiotensinógeno, Filamina A (Alfa-filamina) (Filamina 1) (Proteína endotelial de unión a actina) (ABP-280) (Filamina no muscular), Alfa-actinina 1 (Isoforma citoesquelética de la alfa-actinina) (Alfa-actinina 1 no muscular) (Proteína de reticulación de la F-actina), Precursor de la proteína 2 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (Megalina) (Glicoproteína 330) (gp330), Receptores secuestrantes de macrófagos tipos I y II (Receptores I y II del LDL acetilado de macrófagos), Precursor de tipo IIB del receptor de la activina (ACTR-IIB), Proteína Wnt-9, Proteína ácida fibrilar glial, Astrocitos (GFAP), Proteína C de unión a miosina, tipo cardíaco (MyBP-C cardíaca) (Proteína C, isoforma del músculo cardíaco), o cadena pesada de miosina, tipo A no muscular (Cadena pesada de miosina celular, tipo A) (Cadena-A pesada de miosina no muscular) (NMMHC-A).

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una población de células, en la que al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de células en dicha población aislada son células adherentes derivadas del amnios de la invención que secretan uno o más, o todos, de VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, o galectina-1, por ejemplo, en el medio de cultivo en el que la célula, o células, se hacen crecer.

En otra realización, se proporciona en el presente documento una población de células, en la que al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de células en dicha población aislada de células son células adherentes derivadas del amnios de la invención que expresan micro ARN angiogénicos (miARN) a un nivel superior que las células madre mesenquimales derivados de médula ósea, en el que dichos miARN comprenden uno o más, o todos de, miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, y/o miR-296. En otra realización, se proporciona en el presente documento una población de células, en la que al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, de la invención 95 % o 98 % de células en dicha población aislada de células son células adherentes derivadas del amnios que expresan uno o más de, o todos de, los micro ARN angiogénicos (miARN) a un nivel inferior que las células madre mesenquimales derivados de médula ósea, en el que dichos miARN comprenden uno o más, o todos de, miR-20a, miR-20b, miR-221, miR-222, miR-15b, y/o miR-16. En determinadas realizaciones, las AMDAC de la invención, o poblaciones de dichas AMDAC, expresan una o más, o todos, los miARN angiogénicos miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, miR-296, miR-221, miR-222, miR-15b, y/o miR-16.

En otra realización específica, se proporciona en el presente documento una célula derivada del amnios de la invención, o una población de dichas células derivadas del amnios, que son angiogénicas y expresan niveles aumentados de CD202b, IL-8 y/o VEGF en condiciones hipóxicas (por ejemplo, menos de aproximadamente un 5 % de O₂) en comparación con las condiciones normóxicas (por ejemplo, aproximadamente 20 % o aproximadamente 21 % de O₂).

En otra realización específica, la población aislada de células que comprende células adherentes derivadas del amnios de la presente invención comprende adicionalmente un segundo tipo de célula. En realizaciones específicas, las AMDAC comprenden al menos el 50%, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o al menos 98 % de células de dicha población. En una realización específica, el segundo tipo de célula está contenida o se aísla de sangre placentaria, sangre de cordón umbilical, médula ósea en bruto u otros tejidos. En una realización más específica, dicho segundo tipo de célula es una célula de la sangre, una célula madre aislada de tejido periférico, una célula madre aislada de sangre placentaria, una célula madre aislada de perfusato placentario, una célula madre aislada de tejido placentario, una célula madre aislada de sangre de cordón umbilical, una célula madre del cordón umbilical, una célula madre mesenquimal derivado de médula ósea, una célula estromal del mesénquima, una célula madre hematopoyética, una célula madre somática, un condrocito, un fibroblasto, una célula muscular, una célula endotelial, una célula precursora endotelial, un pericito, un miocito, un cardiomiocito, un mioblasto, un angioblasto, o un cardiomioblasto. En otra realización específica, dicho segundo tipo de célula es una célula madre hematopoyética o una célula precursora, por ejemplo, un linfocito CD34⁺. En otra realización más específica, dicho segundo tipo de célula comprende al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, pero no más de un 50 %, de células en dicha población.

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

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende cualquiera de las células adherentes derivadas del amnios, o poblaciones de células que comprenden las células adherentes derivadas del amnios, de la presente invención, en la que la composición es una matriz o estructura principal de tejido descelularizado permanente o degradable; o una matriz o estructura principal sintética. En una realización más específica, dicha matriz o estructura principal se conforma en la forma de un tubo u

otra forma tridimensional de un organoide. En otra realización más específica, dicha matriz de tejido es una matriz de tejido descelularizada. En otra realización específica, la composición comprende una o más de las células adherentes aisladas derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento, o una población de células que comprende las células adherentes derivadas del amnios, En una solución fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una solución salina, medio de cultivo o similares.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una población aislada de células de la invención para su uso en un método de tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, que comprende administrar una o más de las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento a dicho individuo en una cantidad y durante un tiempo suficiente para la mejora detectable de uno o más síntomas de dicha enfermedad o trastorno. En otra realización, se proporciona en el presente documento una población aislada de células de la invención para su uso en un método de tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, que comprende administrar células adherentes derivadas del amnios a dicho individuo en una cantidad y durante un tiempo suficiente para la mejora detectable de uno o más indicios de la función cardíaca, en el que dichos indicios de la función cardíaca son gasto cardíaco en el pecho (CO), índice cardíaco (CI), presión de enclavamiento de la arteria pulmonar (PAWP), índice cardíaco (CI), % de acortamiento fraccionado (% de FS), fracción de eyección (EF), fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF); diámetro diastólico del extremo ventricular izquierdo (LVEDD), diámetro sistólico del extremo ventricular izquierdo (LVESD), contractilidad (dP/dt), una disminución en el funcionamiento auricular o ventricular, un aumento en la eficacia del bombeo, una disminución en la tasa de pérdida de la eficacia del bombeo, una disminución en la pérdida de funcionamiento hemodinámico, o una disminución en las complicaciones asociadas con la cardiomiopatía, en comparación con el individuo antes de la administración de las células adherentes derivadas del amnios.

En una realización específica, dicha enfermedad o trastorno es infarto de miocardio. En otra realización específica, dicha enfermedad o trastorno es una cardiomiopatía. En otras realizaciones específicas, dicha enfermedad o trastorno es un aneurisma, angina, estenosis aórtica, aortitis, arritmias, arteriosclerosis, arteritis, hipertrofia asimétrica del septo (ASH), aterosclerosis, fibrilación y aleteo auricular, endocarditis bacteriana, síndrome de Barlow (prolapso de la válvula mitral), bradicardia, enfermedad de Buerger (tromboangiitis obliterans), cardiomegalia, carditis, arteriopatía de carótida, coartación de la aorta, defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca congestiva, arteriopatía de coronarias, Síndrome de Eisenmenger, embolia, endocarditis, eritromelalgia, fibrilación, displasia fibromuscular, bloqueo cardíaco, soplo cardíaco, hipertensión, hipotensión, calcificación arterial infantil idiopática, enfermedad de Kawasaki (síndrome de ganglio linfático mucocutáneo, enfermedad de ganglio linfático mucocutáneo, poliarteritis infantil), síndrome metabólico, angina microvascular, miocarditis, taquicardia auricular paroxísmica (PAT), periarteritis nodosa (poliarteritis, poliarteritis nodosa), pericarditis, vasculopatía periférica, isquemia de la extremidad crítica, flebitis, estenosis de la válvula pulmonar (estenosis pulmonar), enfermedad de Raynaud, estenosis de la arteria renal, hipertensión renovascular, enfermedad cardíaca reumática, vasculopatía diabética, defectos del septo, isquemia silenciosa, síndrome X, taquicardia, arteritis de Takayasu, Tetralogía de Fallot, transposición de los grandes vasos, atresia tricúspide, tronco arterioso, cardiopatía valvular, úlceras varicosas, varices, vasculitis, defecto ventricular del septo, síndrome de Wolff-Parkinson-White, defecto del relieve endocárdico, fiebre reumática aguda, pericarditis reumática aguda, endocarditis reumática aguda, miocarditis reumática aguda, cardiopatías reumáticas crónicas, enfermedades de la válvula mitral, estenosis mitral, insuficiencia mitral reumática, enfermedades de la válvula aórtica, enfermedades de otras estructuras endocárdica, cardiopatía isquémica (aguda y subaguda), angina de pecho, cardiopatía pulmonar aguda, embolia pulmonar, cardiopatía pulmonar crónica, cardiopatía cifoscoliótica, miocarditis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibroelastosis endocárdica, bloqueo auriculoventricular, disritmias cardíacas, degeneración miocárdica, enfermedad cerebrovascular, una enfermedad de las arterias, arteriolas y capilares, o una enfermedad de las venas y los vasos linfáticos.

En otras realizaciones específicas, dicha enfermedad o trastorno es una oclusión y estenosis de las arterias precerebrales, o una oclusión de las arterias cerebrales. En un aspecto, se proporciona en el presente documento una población aislada de células de la invención para su uso en un método de tratar a un individuo que tiene una alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro del individuo, por ejemplo, que tiene un síntoma o un déficit neurológico atribuible a una alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro del individuo o el sistema nervioso central (SNC), que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de las AMDAC aisladas. En determinadas realizaciones, la alteración del flujo de sangre da como resultado una lesión anóxica o una lesión hipóxica en el cerebro o el SNC del individuo.

En otras realizaciones específicas, dicha enfermedad o trastorno es una oclusión y estenosis de las arterias periféricas. En un aspecto, se proporciona en el presente documento una población aislada de células de la invención para su uso en un método de tratar a un individuo que tiene una alteración del flujo de sangre en o alrededor de una extremidad, por ejemplo, que tiene un síntoma o un déficit vascular atribuible a una alteración del flujo de sangre en o alrededor del sistema vascular periférico del individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de las AMDAC aisladas. En determinadas realizaciones, la alteración del flujo de sangre da como resultado una lesión anóxica o una lesión hipóxica en los miembros y/o extremidades del individuo.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una población aislada de células de la invención para su uso en un método de tratar a un individuo que padece de una herida o trauma, que comprende administrar una o más

de las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento a dicho individuo en una cantidad y durante un tiempo suficiente para la mejora detectable de dicha herida o trauma.

5 En otra realización específica del uso proporcionado, dichas células se administran a dicho individuo mediante inyección. En una realización más específica, dicha inyección es una inyección en un área isquémica del corazón del individuo. En otra realización específica del uso proporcionado, dichas células se administran a dicho individuo mediante infusión intravenosa. En otra realización específica del método de tratamiento, dichas células, o una población de dichas células, o una población de células que comprende dichas células, se administra a dicho individuo mediante implante en dicho individuo de una matriz o estructura principal que comprende células adherentes derivadas del amnios, como se ha descrito anteriormente.

15 Las células adherentes aisladas derivadas del amnios y las poblaciones de células proporcionadas en el presente documento no son las células madre placentarias aisladas o las poblaciones de células descritas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 7.255879 o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2007/0275362. Las células adherentes aisladas derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento no son también células precursoras endoteliales, células epiteliales amnióticas, trofoblastos, citotrofoblastos, células germinales embrionarias, embriocitoblastos, células obtenidas a partir de la masa de células internas de un embrión, o las células obtenidas de la cresta genital de un embrión.

20 Tal como se usa en el presente documento, El término "aproximadamente" significa, por ejemplo, comprendido en un 10 % de una figura o valor indicado.

25 Tal como se usa en el presente documento, El término "angiogénico", en referencia a las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento, significa que las células pueden formar vasos o brotes similares a vasos, o que las células pueden promover la angiogénesis (por ejemplo, la formación de vasos o estructuras similares a vasos) en otra población de células, por ejemplo, células endoteliales.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "angiogénesis" se refiere al proceso de formación de vasos sanguíneos que incluye, aunque no de forma limitativa, la activación de células endoteliales, la migración, proliferación, remodelación de la matriz y estabilización celular.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "célula madre" define las propiedades funcionales de cualquier población de células dadas que pueden proliferar extensamente, pero no necesariamente de forma infinita, y contribuyen a la formación de múltiples tejidos, tanto durante el desarrollo embriológico como tras la sustitución y reparación del tejido posterior al nacimiento.

40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula precursora" define las propiedades funcionales de cualquier población de células dada que puede proliferar extensamente, pero no necesariamente de forma infinita, y contribuye a la formación de un conjunto restringido de múltiples tejidos en comparación con una célula madre, tanto durante el desarrollo embriológico como tras la sustitución y reparación del tejido posterior al nacimiento.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "derivada" significa aislada o purificada de otra forma. Por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios se aíslan del amnios. El término "derivada" abarca células que se cultivan a partir de células aisladas directamente a partir de un tejido, por ejemplo, el amnios, y las células cultivadas o expandidas a partir de aislados primarios.

50 Tal como se usa en el presente documento, "inmunolocalización" significa la detección de un compuesto, por ejemplo, un marcador celular, usando una proteína inmunitaria, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento del mismo en, por ejemplo, citometría de flujo, clasificación de células activada por fluorescencia, clasificación de células magnéticas, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica, o similares.

55 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula aislada" significa una célula que está sustancialmente separada de otra, células del tejido, por ejemplo, amnios o placenta, a partir de los cuales se deriva la célula. Una célula está "aislada" si al menos aproximadamente un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o al menos un 99 % de las células con las que la célula madre se asocia de forma natural se retiran de la célula, por ejemplo, durante la recogida y/o el cultivo de la célula.

60 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "población aislada de células" significa una población de células que está sustancialmente separada de otras células del tejido, por ejemplo, amnios o placenta, a partir de los cuales se deriva la población de células. Una célula está "aislada" si al menos aproximadamente un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o al menos un 99 % de las células con las que la población de células, o las células a partir de las cuales se deriva la población de células, se asocia de forma natural se retiran de la célula, por ejemplo, durante la recogida y/o el cultivo de las células adherentes derivadas del amnios.

65 Tal como se usa en el presente documento, una célula es "positiva" para un marcador concreto cuando el marcador es detectable sobre el fondo, por ejemplo, mediante inmunolocalización, por ejemplo, mediante citometría de flujo; o

mediante la RT-PCR. Por ejemplo, una célula se describe como positiva, por ejemplo, para CD105 si CD105 es detectable en la célula en una cantidad detectable mayor que la del fondo (en comparación con, por ejemplo, un isotipo del control),. En el contexto de, por ejemplo, la detección mediada por anticuerpos, "positivo", como una indicación de que un marcador concreto de la superficie celular está presente, significa que el marcador es detectable usando un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo marcado fluorescentemente, específico de este marcador; "positivo" significa también que una célula lleva este marcador en una cantidad que produce una señal, por ejemplo, en un citómetro, que es detectable sobre el fondo. Por ejemplo, una célula es "CD105⁺" cuando la célula está marcada de forma detectable con un anticuerpo específico para CD105, y la señal del anticuerpo es más detectable que un control (por ejemplo, el fondo). Por el contrario, "negativo" en el mismo contexto significa que el marcador superficial celular no es detectable usando un anticuerpo específico de este marcador en comparación con el fondo. Por ejemplo, una célula es "CD34⁻" cuando la célula no está marcada de forma detectable con un anticuerpo específico para CD34. salvo que se indique de otra forma en el presente documento, las agrupaciones de marcadores de diferenciación ("CD") se detectan usando anticuerpos. Por ejemplo, se puede determinar que OCT-4 está presente, y una célula es OCT-4⁺, si el ARNm para OCT-4 es detectable usando la RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos.

4. Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la de genes relacionados con células madre mediante las células adherentes derivadas del amnios y las células NTERA-2.

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

La Fig. 3 muestra la secreción de proteínas angiogénicas seleccionadas mediante las células adherentes derivadas del amnios.

La Fig. 4 muestra el efecto angiogénico del medio acondicionado con células adherentes derivadas del amnios en la formación del tubo de la célula endotelial humana (HUVEC).

La Fig. 5 muestra el efecto angiogénico del medio acondicionado con células adherentes derivadas del amnios en la migración de las células endoteliales humanas.

La Fig. 6 muestra el efecto del medio acondicionado con células adherentes derivadas del amnios en la proliferación de células endoteliales humanas.

La Fig. 7 muestra la captación del LDL acetilado por las HUVEC y las células adherentes derivadas del amnios.

La Fig. 8 muestra la formación del tubo de las HUVEC y las células adherentes derivadas del amnios.

La Fig. 9 muestra la secreción de VEGF e IL8 por las células adherentes derivadas del amnios en condiciones hipóxicas y normóxicas.

La Fig. 10 muestra la expresión del marcador celular Tie2 en condiciones normóxicas (aproximadamente 21 % de O₂) e hipóxicas (menos de aproximadamente 5 % de O₂). Eje Y: porcentaje de células positivas para Tie2 mediante citometría de flujo.

La Fig. 11 muestra la potencia de diferenciación cardiomiocítica de las células adherentes derivadas del amnios, en la que la AM se refiere a las células adherentes derivadas del amnios (AMDAC), HD se refiere a la gota pendiente no tratada, HD IND se refiere a la gota pendiente expuesta a condiciones inductoras, y HD IND + 5-AZA se refiere a la inducción en presencia o ausencia de 5-azacitidina. CTRL se refiere a un control de gota pendiente no tratada.

La Fig. 12 muestra el efecto positivo de las AMDAC en un modelo de angiogénesis corioalantoidea de pollo. Lote 1, Lote 2, Lote 3: AMDAC de tres preparaciones de células separadas. bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos (control positivo). MDAMB231: Línea de células de cáncer de mama angiogénico (control positivo). Eje Y: Grado de formación de vasos sanguíneos.

La Fig. 13 muestra el efecto positivo del medio acondicionado con AMDAC sobre la angiogénesis en el modelo de angiogénesis corioalantoidea de pollo. Lote 1, Lote 2, Lote 3: AMDAC de tres preparaciones de células separadas. bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos (control positivo). MDAMB231: Línea de células de cáncer de mama angiogénico (control positivo). Eje Y: Grado de formación de vasos sanguíneos.

Figs. 14A, 14B: Especies de oxígeno reactivo generadas mediante peróxido de hidrógeno presentes en cultivos de astrocitos, cultivos simultáneos de astrocitos y células madre mesenquimales derivados de médula ósea (BM-MSC), o cultivos simultáneos de astrocitos y AMDAC. 14A: AMDAC, Lote 1; 14B: AMDAC, Lote 2. Las condiciones de los HA (astrocitos humanos) solos, astrocitos + H₂O₂, y astrocitos + BM-MSC + H₂O₂ son las mismas para las Figs. 14A y 14B. actividad de RFU ROS: Unidades de fluorescencia relativa para las especies de oxígeno reactivo.

5. Descripción detallada

En un aspecto, La presente invención proporciona una población aislada de células, en la que al menos un 50 % de las células son células adherentes derivadas del amnios, en la que dichas células adherentes derivadas del amnios se adhieren al plástico del cultivo de tejidos, y en la que las células adherentes derivadas del amnios son OCT-4⁻ (proteína 4 de unión a octámero) como se determina mediante la RT-PCR y CD49⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻ y HLA-G⁻ como se determina mediante citometría de flujo.

En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios son VEGFR1/Flt-1⁺ (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular) y VEGFR2/KDR⁺ (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular) como se determina mediante inmunolocalización.

5 En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios son una o de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺ (receptor de la angiopoyetina), TEM-7⁺ (marcador 7 endotelial tumoral), CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻ (enzima convertidora de la angiotensina-1, ACE), CD146⁻ (molécula de adhesión celular a melanoma), o CXCR4⁻ (receptor 4 de la quimioquina (motivo C-X-C)) como se determina mediante inmunolocalización.

10 En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios son CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺ (receptor de la angiopoyetina), TEM-7⁺ (marcador 7 endotelial tumoral), CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, y CXCR4⁻ como se determina mediante inmunolocalización.

15 En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios son VE-caderina⁻ como se determina mediante inmunolocalización.

15 En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios son adicionalmente positivas para CD200⁺ como se determina mediante inmunolocalización.

En determinadas realizaciones, dichas células adherentes derivadas del amnios no expresan CD34 como es detectable mediante inmunolocalización tras exposición a 50 ng/ml de VEGF durante 7 días.

20 En determinadas realizaciones, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % de las células en dicha población son células adherentes derivadas del amnios.

25 En determinadas realizaciones, la población aislada de células comprende un segundo tipo de célula, en la que dicho segundo tipo de célula es, una célula de la sangre, una célula madre aislada de tejido periférico, una célula madre aislada de sangre placentaria, una célula madre aislada de perfusato placentario, una célula madre aislada de tejido placentario, una célula madre aislada de sangre de cordón umbilical, una célula madre del cordón umbilical, una célula madre mesenquimal derivado de médula ósea, una célula del estroma mesenquimal derivada de médula ósea, una célula madre hematopoyética, una célula madre somática, un condrocito, un fibroblasto, una célula muscular, una célula endotelial, un angioblasto, una célula precursora endotelial, un pericito, un cardiomiocito, un miocito, un cardiomioblasto, un mioblasto.

30 En determinadas realizaciones, dicho segundo tipo de célula comprende al menos un 10 % de las células en dicha población o al menos un 25 % de las células en dicha población.

35 En determinadas realizaciones, dicho segundo tipo de célula es una célula madre hematopoyética o una célula precursora.

En determinadas realizaciones, dicha célula madre hematopoyética o célula precursora es una célula CD34⁺.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona una matriz o estructura principal descelularizada o sintética permanente o degradable que comprende la población de células de la presente invención.

45 En determinadas realizaciones, dicha matriz o estructura principal es una membrana amniótica; una matriz extracelular deshidratada; colágeno placentario, o membrana extracelular placentaria.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una población aislada de células de la presente invención, para su uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio en un individuo.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una población aislada de células de la presente invención, para su uso en un método para tratar un individuo que tiene una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor del SNC.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una población aislada de células de la presente invención, para su uso en un método para tratar un individuo que tiene una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor de una extremidad.

60 Finalmente, la presente invención proporciona el uso de la población de células de la presente invención en la fabricación de una composición para tratar un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, en el que dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad o un trastorno del sistema circulatorio, una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor del SNC, o una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor de una extremidad.

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

65 Se proporcionan en el presente documento células angiogénicas adherentes únicas, y poblaciones de dichas células, aislables del amnios, denominadas en el presente documento "células adherentes derivadas del amnios" o AMDAC de la invención. Las células adherentes derivadas del amnios se asemejan superficialmente a las células mesenquimales en la apariencia, que tienen una forma generalmente fibroblastoide. Las células se adhieren a la

superficie del cultivo celular, por ejemplo, al plástico del cultivo de tejidos.

Las AMDAC expresan marcadores celulares que las distinguen de otras células derivadas del amnios, o derivadas de placenta. Por ejemplo, en una realización, la célula adherente derivada del amnios de la invención es OCT-4⁻ (proteína 4 de unión a octámero), como se determina mediante la RT-PCR. Adicionalmente, la célula adherente derivada del amnios de la invención es CD49f⁺, como se determina mediante inmunolocalización y HLA-G⁻, como se determina mediante la RT-PCR. En otra realización específica, la célula AMDAC de la invención es VEGFR1/Flt-1⁺ (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular) y/o VEGFR2/KDR⁺ (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular) como se determina mediante inmunolocalización. En un aspecto específico, la célula adherente OCT-4⁻ derivada del amnios de la invención, o una población de células adherentes OCT-4⁻ derivadas del amnios de la invención, expresan al menos 2 unidades logarítmicas menos que el ARNm amplificado mediante la PCR para OCT-4 en, por ejemplo, 20 ciclos, que una célula NTERA-2, o una población de células NTERA-2 que tienen un número equivalente de células y ciclos de amplificación del ARN. En un aspecto, dicha célula OCT-4⁻ es CD90⁺, CD105⁺, o CD117⁻. En otro aspecto, dicha célula OCT-4⁻ es CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻. En otro aspecto, la célula es OCT-4⁻ o HLA-G⁻, y es adicionalmente CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻. En una realización específica, la célula AMDAC es OCT-4⁻, HLA-G⁻, CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻. En otra realización específica, la célula AMDAC de la invención no expresa SOX2, por ejemplo, como se determina mediante la RT-PCR durante 30 ciclos. En una realización específica, por lo tanto, la célula AMDAC de la invención es OCT-4⁻, CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻ y HLA-G⁻ como se determina mediante inmunolocalización o citometría de flujo, y SOX2⁻, como se determina mediante la RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos.

En otra realización, dicha célula AMDAC de la invención es una o más de CD29⁺, CD73⁺, ABC-p⁺, y CD38⁻, como se determina mediante inmunolocalización.

En otra realización específica, por ejemplo, una célula AMDAC de la invención puede ser adicionalmente una o más de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, TEM-7⁺ (marcador 7 endotelial tumoral), CD31⁻, CD34⁺, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻ (enzima convertidora de la angiotensina-1, ACE), CD146⁻ (molécula de adhesión celular a melanoma), o CXCR4⁻ (receptor 4 de la quimioquina (motivo C-X-C)) como se determina mediante inmunolocalización. En una realización más específica, dicha célula es CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, CD31⁻, CD34⁺, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, y CXCR4⁻ como se determina mediante inmunolocalización, y HLA-G⁻ como se determina mediante la RT-PCR. En una realización, la célula adherente derivada del amnios proporcionada en el presente documento es una o más de CD31⁻, CD34⁺, CD45⁻, y/o CD133⁻. En una realización específica, la célula adherente derivada del amnios de la invención es OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR; VEGFR1/Flt-1⁺ y/o VEGFR2/KDR⁺, como se determina mediante inmunolocalización; y una o más, o todas, de CD31⁻, CD34⁺, CD45⁻, y/o CD133⁻.

En otra realización específica, dicha célula AMDAC de la invención es adicionalmente VE-caderina⁻ como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, dicha célula es adicionalmente positiva para CD105⁺ y CD200⁺ como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, dicha célula AMDAC de la invención no expresa CD34 como se detecta mediante inmunolocalización tras exposición de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En realizaciones más específicas, dicha célula no expresa CD34 como se detecta mediante inmunolocalización tras la exposición de 25 a 75 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días, o de 50 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En realizaciones incluso más específicas, dicha célula no expresa CD34 como se detecta mediante inmunolocalización tras exposición a 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75 o 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En realizaciones aún más específicas, dicha célula no expresa CD34 como se detecta mediante inmunolocalización tras exposición de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 7 a 14 días, por ejemplo, 7 días.

En un aspecto, la célula adherente derivada del amnios es OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y una o más de VE-caderina⁻, VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, y / CD200⁺ como se determina mediante inmunolocalización. En otro aspecto, la célula derivada del amnios es OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y VE-caderina⁻, VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, y CD200⁺ como se determina mediante inmunolocalización. En otro aspecto, dichas células no expresan CD34, como se detecta mediante inmunolocalización, por ejemplo, tras la exposición de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días.

En una realización específica, la célula adherente derivada del amnios es OCT-4⁻, CD49f⁺, HLA-G⁻, CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻. En una realización más específica, dicha célula es adicionalmente una o más de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, CD31⁻, CD34⁺, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, o CXCR4⁻, como se determina mediante inmunolocalización. En una realización más específica, dicha célula es adicionalmente CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, CD31⁻, CD34⁺, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, y CXCR4⁻ como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, dicha célula es adicionalmente VEGFR1/Flt-1⁺ y/o VEGFR2/KDR⁺, como se determina mediante inmunolocalización; y una o más de CD31⁻, CD34⁺, CD45⁻, CD133⁻, y/o Tie-2⁻ como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, dicha célula es adicionalmente VEGFR1/Flt-1⁺, VEGFR2/KDR⁺, CD31⁻, CD34⁺, CD45⁻, CD133⁻, y Tie-2⁻ como se determina mediante inmunolocalización.

En otro aspecto, las células adherentes OCT-4 derivadas del amnios son adicionalmente una o más, o todas, de CD9⁺,

CD10⁺, CD44⁺, CD49f⁺, CD54⁺, CD90⁺, CD98⁺, CD105⁺, CD200⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, VEGFR1/Flt-1⁺, y/o VEGFR2/KDR⁺ (CD309⁺), como se determina mediante inmunolocalización; o adicionalmente una o más, o todas, de CD31⁻, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD117⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD144⁻, CD146⁻, CD271⁻, CXCR4⁻, HLA-G⁻, y/o VE-caderina, como se determina mediante inmunolocalización, o SOX2⁻, como se determina mediante la RT-PCR.

5 En determinados aspectos, las células adherentes aisladas derivadas del amnios que se adhieren al plástico del cultivo de tejidos son CD49f⁺. En un aspecto, dichas células CD49f⁺ son adicionalmente una o más, o todas, de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, CD98⁺, CD105⁺, CD200⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, VEGFR1/Flt-1⁺, y/o VEGFR2/KDR⁺ (CD309⁺), como se determina mediante inmunolocalización; o adicionalmente una o más, o todas, de CD31⁻, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻,
10 CD117⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD144⁻, CD146⁻, CD271⁻, CXCR4⁻, HLA-G⁻, OCT-4⁻ y/o VE-caderina⁻, como se determina mediante inmunolocalización, o SOX2⁻, como se determina mediante la RT-PCR.

15 En determinadas realizaciones diferentes, las células adherentes aisladas derivadas del amnios que se adhieren al plástico del cultivo de tejidos son OCT-4⁻, CD49f⁺ HLA-G⁻, CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻. En una realización específica, dichas células AMDAC de la invención son adicionalmente una o más, o todas, de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, CD200⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, VEGFR1/Flt-1⁺, y/o VEGFR2/KDR⁺ (CD309⁺), como se determina mediante inmunolocalización; o adicionalmente una o más, o todas, de CD31⁻, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD144⁻, CD146⁻, CD271⁻, CXCR4⁻, y/o VE-caderina⁻, como se determina mediante inmunolocalización, o SOX2⁻, como se determina mediante la RT-PCR.

20 En otra realización, las células adherentes aisladas derivadas del amnios de la invención, o una población de dichas células angiogénicas derivadas del amnios, no expresan constitutivamente el ARNm del factor 4 de crecimiento de fibroblastos (FGF4), el interferón γ (IFNG), el ligando 10 de la quimioquina (motivo C-X-C) (CXCL10), la angiopoyetina 4 (ANGPT4), la angiopoyetina de tipo 3 (ANGPTL3), el fibrinógeno de la cadena α (FGA), la leptina (LEP), la prolactina (PRL), la prokineticina 1 (PROK1), tenomodulina (TNMD), la tirosina quinasa 3 de tipo FMS (FLT3), el dominio de unión extracelular que contiene 1 (XLKD1), la caderina 5, tipo 2 (CDH5), quimiotaxina 1 derivada de leucocitos (LECT1), plasminógeno (PLG), transcriptasa inversa telomerasa (*TERT*), (región Y determinante del sexo)-secuencia 2 (SOX2), NANOG, metaloproteasa de matriz 13 (MMP-13), homeobox 5 menos distal (DLX5), proteína gamma-carboxiglutamato (gla) ósea (BGLAP), como se determina mediante la RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos en condiciones de cultivo normalizadas. En otras realizaciones, células adherentes aisladas derivadas del amnios de la invención, la población de dichas células angiogénicas derivadas del amnios, expresan el ARNm de (ARNT2), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), neurotrofina 3 (NT-3), NT-5, Factor 1 α inducible por hipoxia (HIF1A), proteína 2 inducible por hipoxia (HIG2), hemo oxigenasa (desciclación) 1 (HMOX1), Superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn] (SOD3), catalasa (CAT), factor β 1 de crecimiento transformante (TGFB1), receptor del factor β 1 de crecimiento transformante (TGFB1R), y receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGFR/c-met)

40 En otro aspecto, se proporcionan en el presente documento poblaciones aisladas de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento. Las poblaciones de células pueden ser poblaciones homogéneas, por ejemplo, una población de células, al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las cuales son las células adherentes derivadas del amnios. Las poblaciones de células pueden ser heterogéneas, por ejemplo, una población de células en las que a lo sumo aproximadamente el 60 %, 70 % u 80 % de las células en la población son células adherentes derivadas del amnios. Las poblaciones aisladas de células no son, sin embargo, tejido, es decir, membrana amniótica.

45 En una realización, se proporciona en el presente documento una población de células aislada que comprende las AMDAC, por ejemplo, una población de células sustancialmente homogéneas para las AMDAC, en la que dichas AMDAC se adhieren al plástico del cultivo de tejidos, y en la que dichas AMDAC son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, CD49f⁺ y HLA-G⁺, por ejemplo, como se determina mediante inmunolocalización o la RT-PCR.
50 En otra realización específica, dicha población de AMDAC de la invención es VEGFR1/Flt-1⁺ y/o VEGFR2/KDR⁺ como se determina mediante inmunolocalización, en la que dicha población aislada de células no es un amnios o una membrana amniótica. En una realización más específica, las AMDAC de la invención son OCT-4⁻, y HLA-G⁻ como se determina mediante la RT-PCR, y VEGFR1/Flt-1⁺ y/o VEGFR2/KDR⁺ como se determina mediante inmunolocalización. En una realización específica, al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de células en dicha población son las mencionadas células adherentes derivadas del amnios. En una realización más específica, dichas AMDAC de la invención son también CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻. En una realización más específica, las AMDAC son OCT-4⁻, CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻, y HLA-G⁻. En otra realización específica, las AMDAC no expresan SOX2, por ejemplo, como se determina mediante la RT-PCR durante 30 ciclos. En una realización incluso más específica, la población comprende AMDAC, en la que dichas AMDAC son OCT-4⁻, HLA-G⁻, CD49f⁺ CD90⁺,
60 CD105⁺, y CD117⁻, como se determina mediante inmunolocalización o citometría de flujo, y SOX2⁻, por ejemplo, como se determina mediante la RT-PCR durante 30 ciclos.

65 En otro aspecto, dichas AMDAC en dicha población de células son CD90⁺, CD105⁺, o CD117⁻, como se determina mediante inmunolocalización o citometría de flujo. En una realización, las AMDAC de la invención son CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻, como se determina mediante inmunolocalización o citometría de flujo. En una realización más específica, las AMDAC de la invención son OCT-4⁻ y HLA-G⁻, por ejemplo, como se determina mediante la RT-PCR, y son

adicionalmente CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻ como se determina mediante inmunolocalización o citometría de flujo. En una realización más específica, las AMDAC en dicha población de células son OCT-4⁻, HLA-G⁻, CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻. En otra realización específica, las AMDAC de la invención no expresan SOX2, por ejemplo, como se determina mediante la RT-PCR durante 30 ciclos. En una realización específica, por lo tanto, la célula AMDAC

5 de la invención es OCT-4⁻, CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻, y HLA-G⁻, como se determina mediante inmunolocalización o citometría de flujo, y SOX2⁻, como se determina mediante la RT-PCR, por ejemplo, durante 30 ciclos. En una realización específica, las AMDAC son OCT-4⁻, HLA-G⁻, CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻.

10 En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios en la población de células de la invención se adhieren al plástico del cultivo de tejidos, y VEGFR1/Flt-1⁺ y/o VEGFR2/KDR⁺ como se determina mediante inmunolocalización, y son adicionalmente una o más de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, o CXCR4⁻, como se determina mediante inmunolocalización, y en la que dicha población de células aislada no es el amnios. En otra realización, se proporciona en el presente documento una población aislada de células que comprende una célula adherente derivada del amnios de la invención, en la que dicha célula se adhiere

15 al plástico del cultivo de tejidos y es adicionalmente VEGFR1/Flt-1⁺ y VEGFR2/KDR⁺ como se determina mediante inmunolocalización, en la que dicha célula no expresa CD34 como se detecta mediante inmunolocalización tras la exposición de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días, y en la que dicha población de células aisladas no es un amnios. En una realización específica de cualquiera de las anteriores realizaciones, al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de células en dicha población son las mencionadas células adherentes derivadas del amnios.

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

30 Las células adherentes derivadas del amnios, y las poblaciones de células adherentes derivadas del amnios, presentan una expresión característica de proteínas relacionadas con la angiogénesis o genes relacionados con la cardiomiogénesis. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento una célula que expresa, o una población de células, en la que al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las células en dicha población de células aisladas son células adherentes derivadas del amnios que expresan el ARN para uno o más, o todos de, ACTA2 (actina, alfa 2, músculo liso, aorta), ADAMTS1 (metalopeptidasa ADAM con tromboespondina de tipo 1 motivo, 1), AMOT (angiomotina), ANG (angiogenina), ANGPT1 (angiopoyetina 1), ANGPT2, ANGPTL1 (angiopoyetina de tipo 1), ANGPTL2, ANGPTL4, BAI1 (inhibidor 1 de la angiogénesis específico del cerebro), CD44, CD200, CEACAM1 (molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario), CHGA (cromogranina A), COL15A1 (colágeno, de tipo XV, alfa 1), COL18A1 (colágeno, de tipo XVIII, alfa 1), COL4A1 (colágeno, de tipo IV, alfa 1), COL4A2 (colágeno, de tipo IV, alfa 2), COL4A3 (colágeno, de tipo IV, alfa 3), CSF3 (factor 3 estimulador de colonias (granulocitos), CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo), CXCL12 (ligando 12 de la quimioquina (motivo CXC) (factor 1 derivado de células estromales)), CXCL2, DNMT3B (ADN (citosina-5-)-metiltransferasa 3 beta), ECGF1 (timidina fosforilasa), EDG1 (gen 1 de diferenciación de células endoteliales), EDIL3 (repeticiones similares a EGF y dominios 3 similares a discoidina I), ENPP2 (ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2), EPHB2 (receptor B2 de EPH), FBLN5 (FIBULINA 5), F2 (factor de coagulación II (trombina)), FGF1 (factor ácido de crecimiento de fibroblastos), FGF2 (factor básico de crecimiento de fibroblastos), FIGF (factor de crecimiento inducido por c-fos (factor D de crecimiento endotelial vascular)), FLT4 (tirosina quinasa 4 relacionada con fms), FN1 (fibronectina 1), FST (folistatina), FOXC2 (secuencia forkhead de C2 (MFH-1, forkhead 1 de mesénquima)), GRN (granulina), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), HEY1 (motivo 1 piloso/potenciador de la división relacionado con YRPW), HSPG2 (sulfato de heparán proteoglicano 2), IFNB1 (interferón, beta 1, fibroblasto), IL8 (interleuquina 8), IL12A, ITGA4 (integrina, alfa 4; CD49d), ITGAV (integrina, alfa V), ITGB3 (integrina, beta 3), MDK (midkine), MMP2 (metaloproteasa de matriz 2), MYOZ2 (miozenina 2), NRP1 (neuropilina 1), NRP2, PDGFB (factor β de crecimiento derivado de plaquetas), PDGFRA (receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas), PDGFRB, PECAM1 (molécula de adhesión a células endoteliales plaquetarias), PF4 (factor plaquetario 4), PGK1 (fosfoglicerato quinasa 1), PROX1 (prospero homeobox 1), PTN (pleyotrofina), SEMA3F (semoforina 3F), SERPINB5 (inhibidor de la serpina peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 5), SERPINC1, SERPINF1, TIMP2 (inhibidor tisular de las metaloproteinasas 2), TIMP3, TGFA (factor de crecimiento transformante, alfa), TGFB1, THBS1 (tromboespondina 1), THBS2, TIE1 (dominios 1 análogos a EGF y análogos a tirosina quinasa con inmunoglobulina), TIE2/TEK, TNF (factor de necrosis tumoral), TNNI1 (troponina I, tipo 1), TNFSF15 (superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 15), VASH1 (vasohibina 1), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), VEGFB, VEGFC, VEGFR1/FLT1 (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular), y/o VEGFR2/KDR.

65 Cuando se usan células humanas, las designaciones de los genes en todo se refieren a secuencias humanas, y, como es bien conocido por las personas expertas en la materia, se pueden encontrar secuencias representativas en la bibliografía, o en el GenBank. Se pueden determinar las sondas de las secuencias mediante las secuencias que están públicamente disponibles, o a través de fuentes comerciales, por ejemplo, sondas TAQMAN® específicas o la matriz de angiogénesis TAQMAN® (Applied Biosystems, parte n.º 4378710).

Las células adherentes derivadas del amnios, y las poblaciones de células adherentes derivadas del amnios, presentan una expresión característica de las proteínas relacionadas con la angiogénesis. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento una célula que expresa, o una población de células, en la que al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de células en dicha población aislada son células adherentes derivadas del amnios que expresan CD49d, Conexina-43, HLA-ABC, Beta 2-microglobulina, CD349, CD318, PDL1, CD106, Galectina-1, el precursor de ADAM 17 (Una desintegrina y el dominio 17 de la metaloproteínasa) (la enzima convertidora de TNF-alfa) (TNF-alfa convertasa), El precursor del angiotensinógeno, Filamina A (Alfa-filamina) (Filamina 1) (Proteína endotelial de unión a actina) (ABP-280) (Filamina no muscular), Alfa-actinina 1 (Isoforma citoesquelética de la alfa-actinina) (Alfa-actinina 1 no muscular) (Proteína de reticulación de la F-actina), Precursor de la proteína 2 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (Megalina) (Glicoproteína 330) (gp330), Receptores secuestrantes de macrófagos tipos I y II (Receptores I y II del LDL acetilado de macrófagos), Precursor de tipo IIB del receptor de la activina (ACTR-IIB), Proteína Wnt-9, Proteína ácida fibrilar glial, Astrocitos (GFAP), Proteína C de unión a miosina, tipo cardíaco (MyBP-C cardíaca) (Proteína C, isoforma del músculo cardíaco), y/o cadena pesada de miosina, tipo A no muscular (Cadena pesada de miosina celular, tipo A) (Cadena-A pesada de miosina no muscular) (NMMHC-A).

Las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento secretan proteínas que promueven la angiogénesis, por ejemplo, en células endoteliales, células precursoras endoteliales o similares. En determinadas realizaciones, la célula adherente derivada del amnios, la población de células adherentes derivadas del amnios, o la población de células que comprenden las células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo, en la que al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de células en dicha población aislada son células adherentes derivadas del amnios, secretan una o más, o todas, de VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, Folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, Galectina-1, por ejemplo, en el medio de cultivo en el que la célula, o células, se hacen crecer.

En otra realización, cualquiera de las anteriores poblaciones de células que comprenden las células adherentes derivadas del amnios pueden producir la formación de brotes o estructuras similares a tubos en una población de células endoteliales en contacto con dichas células adherentes derivadas del amnios. En una realización específica, las células angiogénicas derivadas del amnios se cultivan simultáneamente con células endoteliales humanas, formando brotes o estructuras similares a tubos, o soportando los brotes de células endoteliales, por ejemplo, cuando se cultivan en presencia de proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno de tipo I y IV, y/o factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), por ejemplo, en o sobre un sustrato tal como colágeno placentario o MATRIGEL™ durante al menos 4 días y/o hasta 14 días.

En otra realización, cualquiera de las anteriores poblaciones de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios secretan factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), o interleuquina-8 (IL-8) y por tanto, pueden inducir células endoteliales humanas que forman brotes o estructuras similares a tubos cuando se cultivan en presencia de proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno de tipo Y y IV, por ejemplo, en o sobre un sustrato tal como colágeno placentario o MATRIGEL™.

En otra realización, se proporciona en el presente documento una población de células, por ejemplo, una población de células adherentes derivadas del amnios, o una población de células en las que al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de células en dicha población aislada de células son células adherentes derivadas del amnios que expresan micro ARN angiogénicos (miARN) a un nivel superior que las células madre mesenquimales derivados de médula ósea., en el que dichos miARN comprenden uno o más, o todos de, miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, y/o miR-296. En otra realización, se proporciona en el presente documento una población de células, por ejemplo, una población de células adherentes derivadas del amnios, o una población de células en las que al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las células en dicha población de células aisladas son células adherentes derivadas del amnios que expresan uno o más, o todos de, los micro ARN angiogénicos (miARN) a un nivel inferior que las células madre mesenquimales derivados de médula ósea, en el que dichos miARN comprenden uno o más, o todos de, miR-20a, miR-20b, miR-221, miR-222, miR-15b, y/o miR-16. En determinadas realizaciones, las AMDAC o las poblaciones de AMDAC, expresan uno o más, o todos, de los miARN angiogénicos miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, (miembros del clúster de miARN angiogénico 17-92), miR-296, miR-221, miR-222, miR-15b, y/o miR-16.

Por tanto, en una realización, se proporciona en el presente documento una célula adherente derivada del amnios de la invención, en la que dicha célula de la invención se adhiere al plástico del cultivo de tejidos, y en la que dicha célula es OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y CD49⁺, HLA-G⁻, CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁻, como se determina mediante inmunolocalización, y en la que dicha célula: (a) expresa una o más de CD9, CD10, CD44, CD54, CD98, CD200, Tie-2, TEM-7, VEGFR1/Flt-1+ o VEGFR2/KDR+ (CD309) como se determina mediante inmunolocalización; (b) carece de la expresión de CD31, CD34, CD38, CD45, CD133, CD143, CD144, CD146, CD271, CXCR4, HLA-G, o VE-caderina, como se determina mediante inmunolocalización o carece de la expresión de SOX2, como se determina mediante la RT-PCR; (c) expresa el ARNm de ACTA2, ADAMTS1, AMOT, ANG, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL1,

ANGPTL2, ANGPTL4, BAI1, CD44, CD200, CEACAM1, CHGA, COL15A1, COL18A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, CSF3, CTGF, CXCL12, CXCL2, DNMT3B, ECGF1, EDG1, EDIL3, ENPP2, EPHB2, FBLN5, F2, FGF1, FGF2, FIGF, FLT4, FN1, FST, FOXC2, GRN, HGF, HEY1, HSPG2, IFNB1, IL8, IL12A, ITGA4, ITGAV, ITGB3, MDK, MMP2, MYOZ2, NRP1, NRP2, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PECAM1, PF4, PGK1, PROX1, PTN, SEMA3F, SERPINB5, SERPINC1, SERPINF1, TIMP2, TIMP3, TGFA, TGFB1, THBS1, THBS2, TIE1, TIE2/TEK, TNF, TNNT1, TNFSF15, VASH1, VEGF, VEGFB, VEGFC, VEGFR1/FLT1, o VEGFR2/KDR; (d) expresa una o más de las proteínas CD49d, Conexina-43, HLA-ABC, Beta 2-microglobulina, CD349, CD318, PDL1, CD106, Galectina-1, ADAM 17, el precursor del angiotensinógeno, la filamina A, alfa-actinina 1, megalina, los receptores I y II del LDL acetilado de macrófagos, el precursor de tipo IIB del receptor de la activina, proteína Wnt-9, proteína ácida fibrilar glial, astrocitos, proteína C de unión a miosina, o cadena pesada de miosina, tipo A no muscular; (e) secreta VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, Folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, o galectina-1 en medio de cultivo, en el que la célula crece; (f) expresa los micro ARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, o miR-296 a un nivel superior que un número equivalente de células madre mesenquimales derivados de médula ósea; (g) expresa los micro ARN miR-20a, miR-20b, miR-221, miR-222, miR-15b, o miR-16 a un nivel inferior que un número equivalente de células madre mesenquimales derivados de médula ósea; (h) expresa los miARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, miR-296, miR-221, miR-222, miR-15b, o miR-16; y/o (i) expresa niveles aumentados de CD202b, IL-8 o VEGF cuando se cultiva en menos de aproximadamente 5 % de O₂, en comparación con la expresión de CD202b, IL-8 o VEGF en 21 % de O₂. En una realización específica, la célula adherente derivada del amnios de la invención es OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y CD49f⁺, HLA-G⁻, CD90⁺, CD105⁺, y CD117⁺, como se determina mediante inmunolocalización, y (a) expresa CD9, CD10, CD44, CD54, CD90, CD98, CD200, Tie-2, TEM-7, VEGFR1/Fit-1, y/o VEGFR2/KDR (CD309), como se determina mediante inmunolocalización; (b) carece de la expresión de CD31, CD34, CD38, CD45, CD133, CD143, CD144, CD146, CD271, CXCR4, HLA-G, y/o VE-caderina, como se determina mediante inmunolocalización o carece de la expresión de SOX2, como se determina mediante la RT-PCR; (c) expresa el ARNm de ACTA2, ADAMTS1, AMOT, ANG, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL1, ANGPTL2, ANGPTL4, BAI1, CD44, CD200, CEACAM1, CHGA, COL15A1, COL18A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, CSF3, CTGF, CXCL12, CXCL2, DNMT3B, ECGF1, EDG1, EDIL3, ENPP2, EPHB2, FBLN5, F2, FGF1, FGF2, FIGF, FLT4, FN1, FST, FOXC2, GRN, HGF, HEY1, HSPG2, IFNB1, IL8, IL12A, ITGA4, ITGAV, ITGB3, MDK, MMP2, MYOZ2, NRP1, NRP2, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PECAM1, PF4, PGK1, PROX1, PTN, SEMA3F, SERPINB5, SERPINC1, SERPINF1, TIMP2, TIMP3, TGFA, TGFB1, THBS1, THBS2, TIE1, TIE2/TEK, TNF, TNNT1, TNFSF15, VASH1, VEGF, VEGFB, VEGFC, VEGFR1/FLT1, y/o VEGFR2/KDR; (d) expresa una o más o todas de CD49d, Conexina-43, HLA-ABC, Beta 2-microglobulina, CD349, CD318, PDL1, CD106, Galectina-1, ADAM 17, el precursor del angiotensinógeno, la filamina A, alfa-actinina 1, megalina, los receptores I y II del LDL acetilado de macrófagos, el precursor de tipo IIB del receptor de la activina, proteína Wnt-9, proteína ácida fibrilar glial, astrocitos, proteína C de unión a miosina, y/o cadena pesada de miosina, tipo A no muscular; (e) secreta VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, Folistatina, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, y/o Galectina-1, por ejemplo, en el medio de cultivo en el que la célula crece; (f) expresa los micro ARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, y/o miR-296 a un nivel superior que un número equivalente de células madre mesenquimales derivados de médula ósea; (g) expresa los micro ARN miR-20a, miR-20b, miR-221, miR-222, miR-15b, y/o miR-16 a un nivel inferior que un número equivalente de células madre mesenquimales derivados de médula ósea; (h) expresa los miARN miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, miR-296, miR-221, miR-222, miR-15b, y/o miR-16; y/o (i) expresa niveles aumentados de CD202b, IL-8 y/o VEGF cuando se cultiva en menos de aproximadamente 5 % de O₂, en comparación con la expresión de CD202b, IL-8 y/o VEGF en 21 % de O₂. Se proporcionan además en el presente documento poblaciones de células que comprenden las AMDAC, por ejemplo, poblaciones de AMDAC, que tienen uno o más de las características anteriormente enumeradas.

En otra realización, cualquiera de las anteriores poblaciones de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios secretan factores angiogénicos. En realizaciones específicas, la población de células secreta el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), y/o interleuquina-8 (IL-8). En otras realizaciones específicas, la población de células que comprende las células angiogénicas derivadas del amnios secreta uno o más factores angiogénicos y, por tanto, induce a las células endoteliales humanas a migrar en un ensayo de cicatrización de heridas *in vitro*. En otras realizaciones específicas, la población de células que comprende células adherentes derivadas del amnios induce la maduración, diferenciación o proliferación de las células endoteliales humanas, precursores endoteliales, miocitos o mioblastos.

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

En otra realización, se proporciona en el presente documento una población de células que comprende células adherentes derivadas del amnios de la invención, en la que dichas células se adhieren al plástico del cultivo de tejidos, y en la que dichas células son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y además son VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁺, o VE-caderina⁺, como se determina mediante inmunolocalización. En realizaciones específicas, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células en dicha población son células adherentes derivadas del amnios de la invención que son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y

además son VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁺, o VE-caderina⁻, como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de células en dicha población son células adherentes derivadas del amnios de la invención que son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y además son VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁺, y VE-caderina⁻, como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, Dichas AMDAC de la invención que son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁺, o VE-caderina⁻, como se determina mediante inmunolocalización, no expresan CD34, como se detecta mediante inmunolocalización, tras la exposición de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En otra realización específica, dichas células son también VE-caderina⁻.

Las poblaciones de células proporcionadas en el presente documento, que comprenden células adherentes derivadas del amnios, son capaces de formar brotes o estructuras similares a tubos que se asemejan a vasos o vasculatura. En una realización, las poblaciones de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios forman brotes o estructuras similares a tubos cuando se cultivan en presencia de una proteína angiogénica, por ejemplo, VEGF, EGF, PDGF o bFGF de la invención. En una realización más específica, dichas células derivadas del amnios de la invención que son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, y VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁺, o VE-caderina⁻, como se determina mediante inmunolocalización, forman brotes o estructuras similares a tubos cuando dicha población de células se cultiva en presencia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

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

Las poblaciones aisladas de células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento pueden comprender aproximadamente, al menos aproximadamente, o no más de aproximadamente, 1 x 10⁵, 5 x 10⁵, 1 x 10⁶, 5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 5 x 10⁸, 1 x 10⁹, 5 x 10⁹, 1 x 10¹⁰, 5 x 10¹⁰, 1 x 10¹¹ o más células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo, en un recipiente. En diversas realizaciones, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células en las poblaciones de células aisladas proporcionadas en el presente documento son células adherentes derivadas del amnios. Es decir, una población de células adherentes derivadas del amnios puede comprender, por ejemplo, como mucho un 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, de células que no son células madre.

Las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento pueden cultivarse sobre un sustrato. En diversas realizaciones, el sustrato puede ser cualquier superficie sobre la cual se puede llevar a cabo el cultivo y/o la selección de las células adherentes derivadas del amnios. Normalmente, el sustrato es plástico, por ejemplo, el plástico de la placa de cultivo de tejidos o el plástico de la placa multipocillos. Se puede tratar el plástico del cultivo de tejidos, revestirse o imprimirse con una biomolécula o un agente mimético sintético, por ejemplo, CELLSTART™, MESENCULT™ ACF-sustrato, ornitina, o polilisina, o una proteína de la matriz extracelular, por ejemplo, colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina, o similares.

Células derivadas del amnios, por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento, y las poblaciones de dichas células, pueden aislarse de una o más placentas. Por ejemplo, una población aislada de las células derivadas del amnios puede ser una población de células placentarias que comprenden dichas células obtenidas de, o contenidas en, tejido del amnios alterado, por ejemplo, un digestato de tejidos (es decir, el conjunto de células obtenidas mediante la digestión enzimática de un amnios), en la que dicha población de células está enriquecida para las células derivadas del amnios, y en la que el tejido es de una única placenta o de dos o más placentas. Las células aisladas derivadas del amnios pueden cultivarse y expandirse para producir poblaciones de dichas células. Las poblaciones de células placentarias que comprenden células adherentes derivadas del amnios pueden también cultivarse y expandirse para producir poblaciones de células adherentes derivadas del amnios.

En determinadas realizaciones, las AMDAC que expresan cualquiera de los anteriores marcadores y/o características de expresión génica se han pasado al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces, o más. En determinadas realizaciones diferentes, las AMDAC que expresan cualquiera de los anteriores marcadores y/o características de expresión génica se han duplicado en cultivo al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42,

43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o al menos 50 veces, o más.

5.2 POBLACIONES DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIO QUE COMPRENDE OTROS TIPOS DE CÉLULAS

5 Las poblaciones aisladas de células que comprenden células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento pueden comprender un segundo tipo de células, por ejemplo, células placentarias que son células adherentes derivadas del amnios, o, por ejemplo, células que no son células placentarias. Por ejemplo, una población aislada de células adherentes derivadas del amnios puede comprender, por ejemplo, puede combinarse con, una población de un segundo tipo de células, en la que dicho segundo tipo de células son, por ejemplo, embriocitoblastos, células de la sangre (por ejemplo, sangre placentaria, células de sangre placentaria, sangre de cordón umbilical, células de la sangre del cordón umbilical, sangre periférica, células de la sangre periférica, células nucleadas procedentes de sangre placentaria, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica, y similares), células madre aisladas de la sangre (por ejemplo, células madre aisladas de sangre placentaria, de sangre del cordón umbilical o de sangre periférica), células madre placentarias (por ejemplo, las células madre placentarias descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.468.276, y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0275362), y células nucleadas procedentes de perfusato de sangre placentaria, por ejemplo, células nucleadas totales procedentes de perfusato placentario; células madre del cordón umbilical, células nucleadas derivadas de poblaciones de sangre, células del estroma mesenquimal derivadas de médula ósea, células madre mesenquimales derivados de médula ósea, células madre hematopoyéticas derivados de médula ósea, médula ósea en bruto, células madre adultas (somáticas), poblaciones de células madre contenidas en tejidos, células cultivadas, por ejemplo, células madre cultivadas, poblaciones de células completamente diferenciadas (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células musculares, células cardíacas, etc.), pericitos, y similares. En una realización específica, una población de células que comprende células adherentes derivadas del amnios comprende células madre placentarias o células madre procedentes del cordón umbilical. En determinadas realizaciones en las que el segundo tipo de célula es de la sangre o de células de la sangre, se han retirado los eritrocitos de la población de células.

30 En una realización específica, el segundo tipo de célula es una célula madre hematopoyética. Dichas células madre hematopoyéticas pueden estar, por ejemplo, contenidos en placenta, sin procesar, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en células nucleadas totales procedentes de sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en una población aislada de células CD34⁺ procedentes de sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en médula ósea sin procesar; en células nucleadas totales procedentes de médula ósea; en una población aislada de células CD34⁺ procedentes de médula ósea, o similares.

35 En otra realización, una población aislada de células adherentes derivadas del amnios se combina con una pluralidad de células adultas o precursoras procedentes del sistema vascular. En diversas realizaciones, las células son células endoteliales, células precursoras endoteliales, miocitos, cardiomiocitos, pericitos, angioblastos, mioblastos o cardiomioblastos.

40 En otra realización, el segundo tipo de célula es un tipo de célula no embrionaria manipulada en cultivo a fin de expresar marcadores de pluripotencia y funciones asociadas con embriocitoblastos.

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

50 Se divulga además en el presente documento una composición que comprende células adherentes derivadas del amnios, y una pluralidad de células madre diferentes de las células adherentes derivadas del amnios. En un aspecto, la composición comprende una célula madre que se obtiene de una placenta, es decir, una célula madre placentario, por ejemplo, células madre placentarias como se describen en las patentes de Estados Unidos números 7.045.148; 7.255.879; y 7.311.905, y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0275362. En algunos aspectos, dichas células madre placentarias son CD200⁺ y HLA-G⁺; CD73⁺, CD105⁺, y CD200⁺; CD200⁺ y OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺; CD73⁺ y CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprenden dichas células madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embriode; u OCT-4⁺ y facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprenden las células madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode; o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, dichas células madre CD200⁺, HLA-G⁺ son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dichas células madre CD73⁺, CD105⁺, y CD200⁺ son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, y HLA-G⁺. En otro aspecto, dichas células madre CD200⁺, OCT-4⁺ son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otro aspecto, dichas células madre CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺ son CD34⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra realización más específica, dichas células madre CD73⁺ y CD105⁺ son OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre OCT-4⁺ son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, y CD45⁻. En otro aspecto, las células madre placentarias son de origen materno (es decir, tienen el genotipo materno). En otro aspecto, las células madre placentarias son de origen fetal (es decir, tienen el genotipo fetal).

En otro aspecto, la composición comprende células adherentes derivadas del amnios, y embriocélulas madre. En otro aspecto, la composición comprende células adherentes derivadas del amnios y células del estroma mesenquimal o células madre, por ejemplo, una célula del estroma mesenquimal derivada de médula ósea o células madre. En otro aspecto, la composición comprende células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea. En otro aspecto, la composición comprende células adherentes derivadas del amnios y células precursoras hematopoyéticas, por ejemplo, células precursoras hematopoyéticas derivadas de médula ósea, sangre fetal, sangre de cordón umbilical, sangre placentaria, y/o sangre periférica. En otro aspecto, la composición comprende células adherentes derivadas del amnios y células madre somáticas. En otro aspecto, dicha célula madre somática es un neurocitoblasto, un hepatocitoblasto, una célula madre pancreático, una célula madre endotelial, un cardiocitoblasto, o una célula madre muscular.

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

Las células en una población aislada de células adherentes derivadas del amnios pueden combinarse con una pluralidad de células de otro tipo, por ejemplo, con una población de células madre, en una relación de aproximadamente 100.000.000:1, 50.000.000:1, 20.000.000:1, 10.000.000:1, 5.000.000:1, 2.000.000:1, 1.000.000:1, 500.000:1, 200.000:1, 100.000:1, 50.000:1, 20.000:1, 10.000:1, 5.000:1, 2.000:1, 1.000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:5.000; 1:10.000; 1:20.000; 1:50.000; 1:100.000; 1:500.000; 1:1.000.000; 1:2.000.000; 1:5.000.000; 1:10.000.000; 1:20.000.000; 1:50.000.000; o aproximadamente 1:100.000.000, en comparación con las cantidades de células nucleadas totales en cada población. Las células en una población aislada de células adherentes derivadas del amnios pueden combinarse también con una pluralidad de células de una pluralidad de tipos celulares.

30 5.3 CRECIMIENTO EN CULTIVO

El crecimiento de las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento, como para cualquier célula de mamífero, depende en parte del medio concreto seleccionado para el crecimiento. En condiciones óptimas, las células adherentes derivadas del amnios duplican normalmente su número en aproximadamente 24 horas. Durante el cultivo, las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento se adhieren a un sustrato en cultivo, por ejemplo, la superficie de un recipiente de cultivo de tejidos (por ejemplo, el plástico de una placa de cultivo de tejidos, plástico revestido de fibronectina, y similares) y forman una monocapa. Normalmente, las células se establecen en cultivo en 2-7 días tras la digestión del amnios. Proliferan a aproximadamente 0,4 a 1,2 duplicaciones de la población por día y pueden experimentar al menos 30 a 50 duplicaciones de la población. Las células expresan un fenotipo análogo al de una célula fibroblástica del mesénquima durante la subconfluencia y la expansión, y una apariencia similar a un cubo/adoquín en la confluencia está fuertemente inhibida por contacto. Las poblaciones de células angiogénicas derivadas del amnios pueden formar cuerpos embrioides durante la expansión en cultivo.

45 5.4 MÉTODOS PARA OBTENER CÉLULAS ANGIOGÉNICAS DERIVADAS DEL AMNIOS

Las células adherentes derivadas del amnios, y las poblaciones de células que comprenden las células adherentes derivadas del amnios, pueden producirse, por ejemplo, aislarse de otras células o poblaciones de células, por ejemplo, mediante métodos particulares de digestión del tejido amniótico, opcionalmente seguidos por la evaluación de las células resultantes o la población celular para la presencia o ausencia de marcadores, o combinaciones de marcadores, característicos de las células adherentes derivadas del amnios y que se seleccionan sobre la base de los marcadores característicos de las células adherentes derivadas del amnios.

Las células adherentes derivadas del amnios, y las poblaciones aisladas de células que comprenden las células adherentes derivadas del amnios, proporcionadas en el presente documento pueden producirse mediante, por ejemplo, digestión del tejido amniótico seguida por selección de las células adherentes. En una realización, por ejemplo, las células adherentes aisladas derivadas del amnios, o una población de células que comprenden las células adherentes derivadas del amnios, se pueden producir (1) dirigiendo el tejido amniótico con una primera enzima para disociar las células de la capa epitelial de las células del amnios procedentes de la capa del mesénquima del amnios; (2) dirigiendo posteriormente la capa del mesénquima del amnios con una segunda enzima para formar una suspensión de células individuales; (3) cultivando las células en dicha suspensión de células individuales sobre una superficie de cultivo de tejidos, por ejemplo, el plástico del cultivo de tejidos; y (4) seleccionando las células que se adhieren a dicha superficie tras un cambio del medio, produciendo por tanto una población aislada de células que comprende células adherentes derivadas del amnios. En una realización específica, dicha primera enzima es tripsina. En una realización más específica, dicha tripsina se usa a una concentración de tripsina 0.25 % (p/v), en 5-20, por ejemplo, 10 mililitros de solución por gramo de tejido amniótico que se va a digerir. En otra realización más específica,

se deja proceder dicha digestión con tripsina durante aproximadamente 15 minutos a 37 °C y se repite hasta tres veces. En otra realización específica, dicha segunda enzima es colagenasa. En una realización más específica, dicha colagenasa se usa a una concentración entre 50 y 500 U/l en 5 ml por gramo del tejido amniótico que se va a digerir. En otra realización más específica, se deja proceder dicha digestión con colagenasa durante aproximadamente 45-60 minutos a 37 °C. En otra realización específica, la suspensión de células individuales formada tras la digestión con colagenasa se filtra mediante, por ejemplo, un filtro de 75 µM - 150 µM entre la etapa (2) y la etapa (3). En otra realización específica, dicha primera enzima es tripsina, y dicha segunda enzima es colagenasa.

Una población aislada de células que comprende células adherentes derivadas del amnios puede, en otra realización, obtenerse seleccionando células entre las células del amnios obtenidas, por ejemplo, tejido amniótico como se describe en otra parte en el presente documento, que expresa una o más características de una célula adherente derivada del amnios. Por ejemplo, una población de células se produce mediante un método que comprende seleccionar células amnióticas que son (a) negativas para OCT-4, como se determina mediante la RT-PCR, positiva para CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁺ y HLA-G- como se determina mediante citometría de flujo, y adicionalmente, positiva para una o más de VEGFR2/KDR⁺, CD9, CD54, CD105, CD200, como se determina mediante inmunolocalización; y aislar dichas células procedente de otras células para formar una población de células. En una realización específica, dichas células amnióticas son adicionalmente VE-caderina⁻. En otro aspecto, se produce una población de células seleccionando células placentarias que son (a) negativas para OCT-4, como se determina mediante la RT-PCR, y VE-caderina, como se determina mediante inmunolocalización, CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁺ y HLA-G- como se determina mediante citometría de flujo, y adicionalmente (b) positivas para cada una de VEGFR2/KDR, CD9, CD54, CD105, CD200, como se determina mediante inmunolocalización; y aislar dichas células procedente de otras células para formar una población de células. En determinadas realizaciones, se lleva a cabo la selección por inmunolocalización antes de la selección mediante la RT-PCR. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células que no expresan el marcador celular CD34 tras el cultivo durante 4 a 21 días en presencia de 1 a 100 ng/ml de VEGF.

En otro aspecto, por ejemplo, se produce una población de células mediante un método que comprende seleccionar células amnióticas que se adhieren al plástico del cultivo de tejidos y son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁺ y HLA-G- como se determina mediante citometría de flujo, y adicionalmente VEGFR1/Flt-1 y VEGFR2/KDR⁺, como se determina mediante inmunolocalización, y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En una realización específica, se produce una población de células mediante un método que comprende seleccionar células amnióticas que son OCT-4⁻, como se determina mediante la RT-PCR, CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁺ y HLA-G- como se determina mediante citometría de flujo, y adicionalmente VEGFR1/Flt-1⁺, VEGFR2/KDR⁺, y HLA-G⁻, como se determina mediante inmunolocalización. En otra realización específica, dicha población de células se produce seleccionando células amnióticas que son adicionalmente una o más, o todas, de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, y/o CXCR4⁻ (receptor 4 de la quimioquina (motivo C-X-C)) como se determina mediante inmunolocalización, y aislar las células de las células que no expresan una o más de estas características. En otra realización específica, dicha población de células se produce seleccionando células amnióticas que son adicionalmente VE-caderina⁻ como se determina mediante inmunolocalización, y aislando las células de las células que son VE-caderina⁺. En otra realización específica, dicha población de células se produce seleccionando células amnióticas que son adicionalmente CD105⁺ y CD200⁺ como se determina mediante inmunolocalización, y aislando las células de células que son CD105⁻ o CD200⁻. En otra realización específica, dicha célula no expresa CD34 como se detecta mediante inmunolocalización tras exposición de 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días.

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

Se pueden confirmar las células seleccionadas para ser las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento cultivando una muestra de las células (por ejemplo, aproximadamente 10⁴ a aproximadamente 10⁵ células) sobre un sustrato, por ejemplo, MATRIGEL™, durante 4 a 14, por ejemplo, 7, días, en presencia de VEGF (por ejemplo, aproximadamente 50 ng/ml), e inspeccionando visualmente las células para la aparición de brotes y/o redes celulares.

Se pueden seleccionar células adherentes derivadas del amnios mediante los anteriores marcadores usando cualquier método conocido en la técnica de la selección celular. Por ejemplo, se pueden seleccionar las células adherentes usando un anticuerpo o anticuerpos en un o más marcadores de la superficie celular, por ejemplo, en inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo o FACS. Se puede llevar a cabo la selección usando anticuerpos junto con perlas magnéticas. Se conocen en la técnica anticuerpos que son específicos para determinados marcadores y están comercialmente disponibles, por ejemplo, anticuerpos contra CD9 (Abcam); CD54 (Abcam); CD105 (Abcam; BioDesign International, Saco, ME, etc.); CD200 (Abcam) citoqueratina (SigmaAldrich). Los anticuerpos contra otros están también comercialmente disponibles, por ejemplo, CD34, CD38 y CD45 están disponibles de, por ejemplo, StemCell Technologies o BioDesign International. Los cebadores para las secuencias de OCT-4 adecuados para la RT-PCR pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, de Millipore o Invitrogen, o pueden derivarse fácilmente de

la secuencia humana con el n.º de registro del GenBank DQ486513.

Se proporcionan a continuación métodos detallados para obtener la placenta y el tejido amniótico, y tratar dicho tejido a fin de obtener las células adherentes derivadas del amnios.

5

5.4.1 Composición de recogida de células

Generalmente, las células pueden obtenerse del amnios de una placenta de mamífero, por ejemplo, una placenta humana, Usando una solución fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una composición de recogida de células. Preferentemente, la composición de recogida de células evita o suprime apoptosis, evita o suprime la muerte celular, la lisis, la descomposición y similares. Se describe en detalle una composición de recogida de células en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0190042, titulada "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs".

10

La composición de recogida de células puede comprender cualquier solución fisiológicamente aceptable adecuada para la recogida y/o el cultivo de células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo, una solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución de Krebs, solución de Krebs modificada, solución de Eagle, NaCl al 0,9%, etc.), un medio de cultivo (por ejemplo, DMEM, H.DMEM, etc.), y similares, con o sin la adición de un componente tamponante, por ejemplo, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES).

15

20

La composición de recogida de células puede comprender uno o más componentes que tienden a conservar las células, por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios, es decir, evitar que las células mueran, o retrasar la muerte de las células, reducir el número de células en una población de células que mueren, o similar, entre el tiempo de recogida y el tiempo de cultivo. Dichos componentes pueden ser, por ejemplo, un inhibidor de la apoptosis (por ejemplo, un inhibidor de la caspasa o un inhibidor de JNK); un vasodilatador (por ejemplo, sulfato de magnesio, un fármaco antihipertensivo, un péptido natriurético auricular (ANP), adrenocorticotropina, hormona liberadora de la corticotropina, nitroprusido de sodio, hidralazina, adenosina trifosfato, adenosina, indometacina o sulfato de magnesio, un inhibidor de la fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de la necrosis (por ejemplo, 2-(1H-Indol-3-il)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina, o clonazepam); un inhibidor de TNF- α ; y/o un perfluorocarbono que transporta oxígeno (por ejemplo, bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

25

30

La composición de recogida de células puede comprender una o más enzimas degradadoras de tejidos, por ejemplo, una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una ARNasa, o una ADNasa, o similares. Dichas enzimas incluyen, aunque no de forma limitativa, colagenasas (por ejemplo, colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa procedente de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASE™, hialuronidasa, y similares. El uso de las composiciones de recogida de células que comprende enzimas digestoras de tejidos se discute con más detalle a continuación.

35

La composición de recogida de células puede comprender una cantidad bactericida o bacteriostáticamente eficaz de un antibiótico. En determinadas realizaciones no limitantes, el antibiótico es un macrólido (por ejemplo, tobramicina), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozilo, cefaclor, cefixime o cefadroxil), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (por ejemplo, penicilina V) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En una realización concreta, el antibiótico es activo contra bacterias Gram(+) y/o Gram(-), por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y similares.

40

45

La composición de recogida de células puede comprender también uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM); iones magnesio (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); una macromolécula de peso molecular mayor de 20.000 daltons, en una realización, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad endotelial y la viabilidad celular (por ejemplo, un coloide de origen sintético o natural), un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (por ejemplo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presente de aproximadamente 25 μ M a aproximadamente 100 μ M); un agente reductor (por ejemplo, N-acetilcisteína presente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que evita la entrada de calcio en las células (por ejemplo, varapamilo presente de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 25 μ M); nitroglicerina (por ejemplo, aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 0,2 g/l); un anticoagulante, en una realización, presente en una cantidad suficiente para ayudar a evitar la coagulación de la sangre residual (por ejemplo, heparina o hirudina presente a una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o una amilorida que contiene el compuesto (por ejemplo, amilorida, etil isopropil amilorida, hexametilen amilorida, dimetil amilorida o isobutil amilorida presente a aproximadamente 1,0 μ M a aproximadamente 5 μ M).

50

55

60

También pueden recogerse las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento, por ejemplo, durante y después de la digestión como se describe a continuación, en un tampón simple fisiológicamente aceptable, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, una solución de NaCl al 0,9%, medio de cultivo celular,

65

o similares.

5.4.2 Recogida y manipulación de la placenta

5 Generalmente, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión tras el nacimiento, o después, por ejemplo, tras una cesárea. En una realización preferida, la placenta se recupera de una paciente tras el consentimiento informado y después que se obtienen los antecedentes médicos del paciente y se asocian con la placenta. Preferentemente, los antecedentes médicos continúan tras la administración. Dichos antecedentes médicos se pueden usar para coordinar el uso posterior de la placenta o las células extraídas de la misma. Por ejemplo, se pueden usar, 10 células placentarias humanas, por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios, a la luz de los antecedentes médicos, para la medicina personalizada del niño, o un pariente cercano, asociado con la placenta, o para los padres, hermanos u otros parientes del bebé.

15 Antes de la recuperación de las células adherentes derivadas del amnios, la sangre del cordón umbilical y la sangre placentaria se retiran. En determinadas realizaciones, tras la administración, la sangre del cordón en la placenta se recupera. La placenta puede someterse a un proceso de recuperación convencional de la sangre del cordón. Normalmente se usa una aguja o una cánula, con la ayuda de la gravedad, para exsanguinar la placenta (véase, por ejemplo, Anderson, patente de Estados Unidos n.º 5,372,581; Hessel et al., patente de Estados Unidos n.º 5.415.665). La aguja o cánula se coloca usualmente en la vena umbilical y la placenta puede masajearse suavemente para ayudar 20 en el drenaje de la sangre del cordón procedente de la placenta. Dicha recuperación de la sangre del cordón puede llevarse a cabo comercialmente, por ejemplo, LifeBank USA, Cedar Knolls, N. J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell. Preferentemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional con el fin de minimizar la alteración del tejido durante la recuperación de la sangre del cordón.

25 Normalmente, una placenta se transporta desde el paritorio a otra ubicación, por ejemplo, un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y la recogida de células mediante, por ejemplo, la perfusión o disociación del tejido. La placenta se transporta preferentemente en un dispositivo transportador estéril, aislado térmicamente (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28 °C), por ejemplo, colocando la placenta, con el cordón umbilical proximal sujeto, en una bolsa de plástico estéril con cierre de cremallera, que se coloca a continuación en un recipiente aislado. En otra realización, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre del cordón 30 sustancialmente como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7.147.626. Preferentemente, la placenta se entrega al laboratorio cuatro a veinticuatro horas después del parto. En determinadas realizaciones, se sujeta el cordón umbilical proximal, preferentemente en 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de la sangre del cordón. En otras realizaciones, el cordón umbilical proximal se sujeta tras la recuperación 35 de la sangre del cordón pero antes de procesar adicionalmente la placenta.

La placenta, antes de la recogida de células, puede almacenarse en condiciones estériles a una temperatura de, por ejemplo, 4 a 25 °C (centígrados), por ejemplo, a temperatura ambiente. La placenta puede almacenarse para, por ejemplo, un periodo de cero a veinticuatro horas, hasta cuarenta y ocho horas, o más de cuarenta y ocho horas, antes 40 de perfundir la placenta para retirar cualquier sangre del cordón residual. En una realización, la placenta se recoge entre aproximadamente cero horas a aproximadamente dos horas después de la expulsión. La placenta puede almacenarse en una solución anticoagulante a una temperatura de, por ejemplo, 4 a 25 °C (centígrados). Las soluciones anticoagulantes adecuadas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar una solución de citrato de sodio, heparina o warfarina sódica. En una realización preferida, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (por ejemplo, 1 % p/p en una solución 1:1000). La placenta exsanguinada se almacena 45 preferentemente durante no más de 36 horas antes de que se recojan las células.

5.4.3 Alteración física y digestión enzimática del tejido amniótico

50 En una realización, el amnios se separa del resto de la placenta, por ejemplo, mediante disección roma, por ejemplo, utilizando los dedos. Se puede diseccionar el amnios, por ejemplo, en partes o segmentos de tejido, antes de la digestión enzimática y la recuperación de células adherentes. Se pueden obtener las células adherentes derivadas del amnios de un amnios completo, u de un segmento pequeño del amnios, por ejemplo, un segmento del amnios que tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 55 800, 900 o aproximadamente 1000 milímetros cuadrados por área.

Las células adherentes derivadas del amnios pueden recogerse generalmente a partir de un amnios placentario o una porción del mismo, en cualquier momento en aproximadamente los primeros tres días después de la expulsión, pero preferentemente entre aproximadamente 0 horas y 48 horas después de la expulsión, o aproximadamente 8 horas y 60 aproximadamente 18 horas después de la expulsión.

En una realización, las células adherentes derivadas del amnios se extraen del tejido amniótico mediante digestión enzimática utilizando una o más enzimas digestoras de tejido. El amnios, o una parte del mismo, puede, por ejemplo, digerirse con una o más enzimas disueltas o mezcladas en una composición de recogida de células como se ha descrito anteriormente. 65

En determinadas realizaciones, la composición de recogida de células comprende una o más enzimas degradadoras de tejidos. La digestión enzimática utiliza preferentemente una combinación de enzimas, por ejemplo, una combinación de una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra, por ejemplo, una combinación de dispasa y colagenasa, por ejemplo, utilizada en orden secuencial. Cuando se utiliza más de una proteasa, las proteasas pueden utilizarse en el mismo momento para digerir el tejido amniótico, o pueden utilizarse en serie. En una realización, por ejemplo, el tejido amniótico se digiere tres veces con tripsina y a continuación una vez con colagenasa.

En una realización, el tejido amniótico se digiere enzimáticamente con una o más de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra, y una enzima mucolítica. En una realización específica, el tejido amniótico se digiere con una combinación de colagenasa, dispasa, y hialuronidasa. En otra realización específica, el tejido amniótico se digiere con una combinación de LIBERASE™ (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, Ind.) y hialuronidasa. Otras enzimas que se pueden usar para alterar el tejido amniótico incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina, o elastasa. Las serina proteasas pueden inhibirse por la alfa 2 microglobulina en suero y por tanto, el medio usado para la digestión puede, en determinadas realizaciones, estar exento de suero. En determinadas realizaciones diferentes, se usan EDTA y ADNasa en la digestión del tejido amniótico, por ejemplo, para aumentar la eficacia de la recuperación celular. En determinadas realizaciones diferentes, el digestato se diluye con el fin de evitar el atrapamiento de las células en la digestión viscosa.

Las concentraciones típicas para las enzimas digestoras de tejidos incluyen, por ejemplo, 50-200 U/ml para la colagenasa I y la colagenasa IV, 1-10 U/ml para la dispasa, y 10-100 U/ml para la elastasa. Las proteasas se pueden usar en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o se pueden usar secuencialmente a fin de aislar las células adherentes derivadas del amnios. Por ejemplo, en una realización, el tejido amniótico, o parte del mismo, se digiere en primer lugar con una cantidad adecuada de tripsina, a una concentración de aproximadamente el 0,25 %, durante, por ejemplo, 15 minutos, a 37 °C, seguido por la colagenasa I de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 mg/ml durante, por ejemplo, 45 minutos.

En una realización, las células adherentes derivadas del amnios pueden obtenerse del siguiente modo. La membrana amniótica se corta en segmentos de aproximadamente 0,1" x 0,1" a aproximadamente 5" x 5" (0,25 cm x 0,25 cm a aproximadamente 12,7 cm x 12,7 cm), por ejemplo, 2" x 2" (5,08 cm x 5,08 cm), de tamaño. La monocapa epitelial se retira del lado fetal de la membrana amniótica mediante tripsinización triple del siguiente modo. Los segmentos de la membrana amniótica se colocan en un recipiente con calor (por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C) de solución de tripsina-EDTA (0,25 %). El volumen de tripsina puede variar desde aproximadamente 5 ml por gramo del amnios a aproximadamente 50 ml por gramo del amnios. El recipiente se agita durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, 15 minutos, manteniendo a la vez la temperatura constante. A continuación se separan los segmentos de la membrana amniótica de la solución de tripsina mediante cualquier método adecuado, tal como retirando manualmente los segmentos amnióticos, o mediante filtración. Se puede repetir la etapa de tripsinización al menos una vez más.

Tras el término de la tripsinización final, los segmentos de la membrana amniótica se colocan posteriormente en el recipiente relleno con solución de neutralización de tripsina caliente, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS)/FBS al 10 %, PBS/FBS al 5 % o PBS/FBS al 3 %. El recipiente se agita durante aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, 5 minutos. Los segmentos de la membrana amniótica se separan a continuación de la solución de neutralización de tripsina como se ha descrito anteriormente, y los segmentos de la membrana amniótica se colocan en el recipiente relleno con PBS caliente, pH 7,2. El recipiente se agita durante aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 30 minutos, y los segmentos de la membrana amniótica se separan a continuación del PBS como se ha descrito anteriormente.

A continuación, los segmentos de la membrana amniótica se colocan en el recipiente relleno con solución de digestión caliente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C). El volumen de solución de digestión puede variar desde aproximadamente 5 ml por gramo de amnios a aproximadamente 50 ml por gramo de amnios. Las soluciones de digestión comprenden enzimas de digestión en un medio de cultivo adecuado, tal como DMEM. Las soluciones de digestión típicas incluyen colagenasa de tipo I (aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 500 U/ml); colagenasa de tipo I (aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 500 U/ml) más dispasa (aproximadamente 5 U/ml a aproximadamente 100 U/ml); y colagenasa de tipo I (aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 500 U/ml), dispasa (aproximadamente 2 U/ml a aproximadamente 50 U/ml) y hialuronidasa (aproximadamente 3 U/ml a aproximadamente 10 U/ml). El recipiente se agita a 37 °C hasta que la digestión del amnios está prácticamente completa (aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 90 minutos). A continuación se añade PBS/FBS al 5 % caliente al recipiente a una relación de aproximadamente 1 ml por gramo de tejido amniótico a aproximadamente 50 ml por gramo de tejido amniótico. El recipiente se agita durante aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 5 minutos. A continuación, la suspensión celular se filtra para eliminar cualquier tejido sin digerir utilizando un filtro de 40 µm a 100 µm. Las células se suspenden en PBS caliente (aproximadamente 1 ml a aproximadamente 500 ml), y a continuación se centrifuga de 200 x g a aproximadamente 400 x g durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, 300 x g durante aproximadamente 15 minutos a 20 °C. Tras la centrifugación, se retira el sobrenadante y las células se resuspenden en un medio de cultivo adecuado. La suspensión de células puede filtrarse (filtro de 40 µm a 70 µm) para retirar cualquier tejido sin digerir restante, dando como resultado una suspensión de células individuales.

En esta realización, las células en la suspensión se recogen y cultivan como se ha descrito en otras partes en el presente documento para producir células adherentes derivadas de amnios aisladas, y poblaciones de dichas células. El amnios sin digerir restante, en esta realización, puede descartarse. Las células liberadas del tejido amniótico pueden, por ejemplo, recogerse, por ejemplo, mediante centrifugación, y cultivarse en medio de cultivo de células normalizado.

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

Junto con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las AMDAC pueden aislarse de las células liberadas durante la digestión seleccionando las células que expresan una o más características de las AMDAC, como se describe en la sección 5.1, anterior.

Las AMDAC pueden también, por ejemplo, aislarse usando un método de aislamiento en dos etapas específico que comprende la digestión con tripsina seguida por la digestión con colagenasa. Por tanto, en otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método de aislamiento de células adherentes derivadas del amnios que comprende digerir una membrana amniótica o una parte de la misma con tripsina de tal manera que las células epiteliales se liberan de dicha membrana amniótica; eliminando la membrana amniótica o una parte de la misma de dichas células epiteliales; digiriendo adicionalmente la membrana amniótica o una parte de la misma con colagenasa de tal manera que se liberan las células adherentes derivadas del amnios de dicha membrana amniótica o parte de la misma; y separando dichas células adherentes derivadas del amnios de dicha membrana amniótica. En una realización específica, la digestión de la membrana amniótica o parte de la misma se repite al menos una vez. En otra realización específica, la digestión de la membrana amniótica o parte de la misma con colagenasa se repite al menos una vez. En otra realización específica, la tripsina está a aproximadamente 0,1 %-1,0 % (concentración final). En una realización más específica, la tripsina está a aproximadamente el 0,25 % (concentración final). En otra realización específica, la colagenasa está a aproximadamente 50 U/ml a aproximadamente 1000 U/ml (concentración final). En una realización más específica, la colagenasa está a aproximadamente 125 U/ml (concentración final). En otra realización específica, el método de aislamiento comprende adicionalmente cultivar dichas células adherentes derivadas del amnios en cultivo celular y separar dichas células adherentes derivadas del amnios de las células no adherentes en dicho cultivo para producir una población enriquecida de células adherentes derivadas del amnios. En realizaciones más específicas, al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de células en dicha población enriquecida de células adherentes derivadas del amnios son dichas células adherentes derivadas del amnios.

En una realización más específica de los anteriores métodos, las células adherentes derivadas del amnios son negativas para OCT-4-, como se determina mediante la RT-PCR, y una o más de HLA-G⁺, CD90⁺, CD105⁺, y CD117-, como se determina mediante citometría de flujo.

5.4.4 Aislamiento, clasificación y caracterización de las células adherentes derivadas del amnios

Se pueden resuspender aglomerados celulares en una composición de recogida de células reciente, como se ha descrito anteriormente, o un medio adecuado para el mantenimiento de las células, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM); medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), por ejemplo, Medio IMDM exento de suero que contiene 2U/ml de heparina y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY); una mezcla de tampón (por ejemplo, PBS, HBSS) con FBS (por ejemplo, 2 % v/v); o similares.

Las células adherentes derivadas del amnios que se han cultivado, por ejemplo, sobre una superficie, por ejemplo, sobre el plástico del cultivo de tejidos, con o sin un revestimiento de matriz extracelular adicional tal como fibronectina, pueden pasarse o aislarse mediante adherencia diferencial. Por ejemplo, puede cultivarse una suspensión de células obtenida de la digestión de la colagenasa del tejido amniótico, llevada a cabo como se describe en la Sección 5.4.3. anteriormente, por ejemplo, durante 3-7 días en medio de cultivo sobre el plástico del cultivo de tejidos. Durante el cultivo, una pluralidad de células en la suspensión se adhiere a la superficie del cultivo, y, tras un cultivo continuado, proporciona un aumento de las células adherentes derivadas del amnios. Las células no adherentes, que no proporcionan aumento en las células adherentes derivadas del amnios, se eliminan durante el intercambio del medio.

Se puede controlar el número y tipo de células recogidas del amnios, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y los marcadores superficiales celulares usando técnicas de detección celular normalizadas tales como inmunolocalización, por ejemplo, citometría de flujo, clasificación celular, inmunocitoquímica (por ejemplo, tinción con anticuerpos específicos de tejidos o anticuerpos específicos de marcadores celulares) clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), mediante examen de la morfología de las célula usando luz o microscopía confocal, y/o midiendo los cambios en la expresión génica usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como la PCR y el perfilamiento de le expresión génica. Estas técnicas se

pueden utilizar, además, para identificar células que son positivas para uno o más marcadores concretos. Por ejemplo, utilizando uno o más anticuerpos contra CD34, se puede determinar, utilizando las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; si es así, la célula es CD34⁺.

- 5 Las células derivadas del amnios, por ejemplo, las células que se han aislado mediante separación de Ficoll, adherencia diferencial, o una combinación de ambos, pueden clasificarse usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluyendo células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (véase, por ejemplo, Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151:150-165). La excitación por láser de los restos fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de las partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos o ligandos específicos de marcadores superficiales celulares se marcan con etiquetas fluorescentes distintas. Las células se procesan mediante el clasificador de células, permitiendo la separación de células basada en su capacidad de unirse a los anticuerpos utilizados. Las partículas clasificadas FACS pueden depositarse directamente en placas con pocillos individuales o de 15 96 pocillos o placas de 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

- En un esquema de clasificación, las células de placenta, por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios, se pueden clasificar sobre la base de la expresión de los marcadores de CD49f, VEGFR2/KDR, y/o Flt-1/VEGFR1. Preferentemente las células se identifican siendo OCT-4⁻, por ejemplo, determinando la expresión de OCT-4 mediante la RT-PCR en una muestra de las células, en la que las células son OCT-4⁻ si las células en la muestra fracasan en mostrar una producción detectable de ARNm para OCT-4 después de 30 ciclos. Por ejemplo, las células del amnios que son VEGFR2/KDR⁺ y VEGFR1/Flt-1⁺ se pueden clasificar a partir de células de células que son una o más de VEGFR2/KDR, y VEGFR1/Flt-1⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁻, y/o VE-caderina⁻. En un ejemplo, las células que se adhieren al plástico del cultivo de tejidos derivadas del amnios que son una o más de CD49f⁺ VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁺, y/o VE-caderina⁻, o las células que son VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁺, y VE-caderina⁻, se clasifican aparte de las células que no expresan uno o más de dichos marcadores, y se seleccionan. En otro ejemplo de células CD49f⁺, VEGFR2/KDR⁺, VEGFR1/Flt-1⁺ que son adicionalmente una o más, o todas, de CD31⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD133⁻, y/o Tie-2⁺ se clasifican a partir de células que no expresan una o más, o ninguna, de dichas características. En otro ejemplo, las células VEGFR2/KDR⁺, VEGFR1/Flt-1⁺ que son adicionalmente una o más, o todas, de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺, TEM-7⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻, y/o CXCR4⁻, se clasifican a partir de células que no expresan una o más, o ninguna, de dichas características.

- Se puede llevar a cabo la selección de células adherentes derivadas del amnios en una suspensión celular resultante de la digestión, o en células aisladas recogidas del digestato, por ejemplo, mediante centrifugación o separación usando citometría de flujo. La selección por los marcadores expresados puede llevarse a cabo sola o, por ejemplo, junto con procedimientos para seleccionar células sobre la base de sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una selección mediante adherencia antes o después de la clasificación sobre la base de la expresión del marcador.

- 40 Con respecto a la detección mediada por anticuerpos y la clasificación de las células placentarias, se puede usar cualquier anticuerpo específico de un marcador concreto, en combinación con algún fluoróforo u otra etiqueta adecuada para la detección y la clasificación de células (por ejemplo, clasificación celular activada por fluorescencia). Las combinaciones de anticuerpos/fluoróforos para marcadores específicos incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína contra CD105 (disponible de R&D Systems Inc., Mineápolis, Minesota); anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (PE) contra CD200 (BD Biosciences Pharmingen); VEGFR2/KDR-Biotina (CD309, Abcam), y similares. Los anticuerpos para cualquiera de los marcadores divulgados en el presente documento pueden etiquetarse con cualquier etiqueta normalizada para anticuerpos que facilite la detección de los anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, acetilcolinesterasa estreptavidina/biotina, avidina/biotina, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina(PE), luminol, luciferasa, luciferina, y aecuorina, y los ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S o ³H.

- Las células adherentes derivadas del amnios pueden etiquetarse con un anticuerpo para un único marcador y detectarse y clasificarse basándose en el marcador individual, o pueden etiquetarse simultáneamente con múltiples anticuerpos hasta una pluralidad de diferentes marcadores y clasificarse basándose en la pluralidad de los marcadores.

- En otra realización, se pueden usar perlas magnéticas para separar células, por ejemplo, para separar las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento de otras células amnióticas. Las células pueden clasificarse usando una técnica de células activadas magnéticamente (MACS), un método para separar partículas basado en su capacidad de unirse a perlas magnéticas (0,5-100 μm de diámetro). Se puede llevar a cabo varias modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluyendo la adición covalente del anticuerpo que reconoce específicamente una molécula superficial de una célula concreta o hapteno. Las perlas se mezclan a continuación con las células para permitir la unión. A continuación, las células se pasan a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador superficial celular específico. En una realización, estas células se pueden aislar a continuación y volverse a mezclar con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de la superficie

celular adicionales. Las células se pasan de nuevo a través de un campo magnético, aislando las células que se unen a ambos anticuerpos. Dichas células pueden a continuación diluirse en placas separadas, tales como placas de microvaloración para el aislamiento clonal.

- 5 Se pueden evaluar las células adherentes derivadas del amnios para la viabilidad, el potencial de proliferación, y la longevidad utilizando técnicas normalizadas conocidas en la materia, tales como el ensayo de exclusión del azul tripán, el ensayo de captación del diacetato de fluoresceína, el ensayo de captación del yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y el ensayo de captación de la timidina o el ensayo de proliferación de las células MTT (para evaluar la proliferación). Se puede determinar la longevidad mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como
10 determinando el número máximo de duplicaciones de la población en un cultivo extendido.

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

20 5.5 CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

5.5.1 Medio de cultivo

- Las células adherentes aisladas derivadas del amnios, o las poblaciones de dichas células, se pueden usar para iniciar,
25 o la siembra de cultivos celulares. Las células se transfieren generalmente a recipientes de cultivo de tejidos estériles tanto sin revestir como revestidos con matriz extracelular o biomoléculas tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

- 30 Las AMDAC pueden, por ejemplo, establecerse en un medio adecuado para el cultivo de células madre. El medio de establecimiento puede, por ejemplo, incluir medio EGM-2 (Lonza), DMEM + 10 % de FBS, o medio que comprende 60 % de DMEM-LG (Gibco), 40 % de MCDB-201 (Sigma), 2 % de suero de feto de ternera (FCS) (Hyclone Laboratories), IX insulina-transferrina-selenio (ITS), IX ácido linoléico-albúmina de suero de bovino (LA-BSA), 10⁻⁹ M de dexametasona (Sigma), 10⁻⁴M de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma), factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10
35 ng/ml (R&D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (R&D Systems), y 100 U de penicilina/1000 U de estreptomina (denominado en el presente documento "medio convencional").

- Las células adherentes derivadas del amnios se pueden cultivar en cualquier medio, en cualquier condición, reconocida en la técnica como aceptable para el cultivo de células, por ejemplo, células madre placentarias
40 adherentes. Preferentemente, el medio de cultivo comprende suero. En diversas realizaciones, los medios para el cultivo o subcultivo de las AMDAC incluye STEMPRO® (Invitrogen), MSCM-sf (ScienCell, Carlsbad, CA), medio MESENCULT®-ACF (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), medio convencional, EGF que carece de medio convencional, PDGF que carece de medio convencional, DMEM + 10 % de FBS, EGM-2 (Lonza), EGM-2MV (Lonza), 2 %, 10 % y 20 % de medio ES, medio ES-SSR, o α -MEM-FBS al 20 %. El medio aceptable para el cultivo de las
45 células adherentes derivadas del amnios incluye, por ejemplo, DMEM, IMDM, DMEM (concentración alta o baja de glucosa), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, Medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM Lonza), Medio ADVANCESTEM™ (Hyclone), KNOCKOUT™ DMEM (Invitrogen), medio L-15 de Leibovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), y CELL-GRO FREE, o similares. En diversas realizaciones, por ejemplo,
50 DMEM-LG (Medio esencial modificado por Dulbecco, concentración baja de glucosa)/MCDB 201 (medio basal de fibroblastos de pollo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA+BSA (ácido linoleico-albúmina de suero de bovino), dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1, y penicilina/estreptomina; DMEM-HG (concentración alta de glucosa) que comprende aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente un 10 %, de suero de feto de bovino (FBS; por ejemplo, suero de feto de bovino definido, Hyclone, Logan Utah); DMEM-HG que
55 comprende aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente un 15 %, FBS; IMDM (medio de Dulbecco modificado por Iscove) que comprende aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente un 10 %, FBS, aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente un 10 %, suero de caballo, e hidrocortisona; M199 que comprende aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente un 10 %, FBS, EGF, y heparina; α -MEM (medio esencial mínimo) que comprende aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente un 10 %, FBS,
60 GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende FBS al 10 %, GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM-LG que comprende aproximadamente 2 a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente un 15 %, (v/v) suero de feto de bovino (por ejemplo, suero de feto de bovino definido, Hyclone, Logan Utah), antibióticos/antimicrobianos (por ejemplo, penicilina a aproximadamente 100 Unidades/mililitro), estreptomina a 100 microgramos/mililitro, y/o
65 anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), y 0,001 % (v/v) β -mercaptoetanol (Sigma, St. Louis Mo.); medio basal KNOCKOUT™-DMEM medio basal suplementado con 2 a 20 % de FBS, aminoácidos no

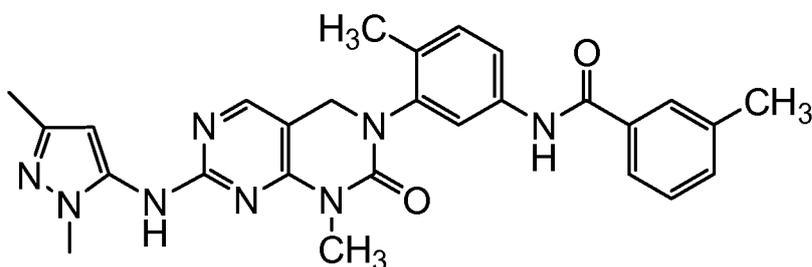
esenciales (Invitrogen), beta-mercaptoetanol, medio basal KNOCKOUT™ suplementado con KNOCKOUT™ Serum Replacement, alfa-MEM que comprende 2 a 20 % de FBS, medio basal EBM2™ suplementado con EGF, VEGF, bFGF, R3-IGF-1, hidrocortisona, heparina, ácido ascórbico, FBS, gentamicina), o similares.

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

15 Las células adherentes derivadas del amnio (AMDAC) pueden cultivarse en condiciones de cultivo de tejidos convencionales, por ejemplo, en placas de cultivo de tejidos o placas multipocillos. Las células pueden cultivarse también utilizando un método de gota pendiente. En este método, las células se suspenden a aproximadamente 1×10^4 células por ml en aproximadamente 5 ml de medio, y una o más gotas del medio se colocan en el interior de la tapa de un recipiente de cultivo de tejidos, por ejemplo, una placa Petri de 100 ml. Las gotas pueden ser, por ejemplo, gotas únicas, o gotas múltiples procedentes, por ejemplo, de una pipeta multicanal. La tapa se invierte cuidadosamente y se coloca en la parte superior del fondo de la placa, que contiene un volumen de líquido, por ejemplo, PBS estéril suficiente para mantener el contenido de humedad en la atmósfera de la placa, y se cultivan las células. Las AMDAC se pueden cultivar también en sistemas de cultivo convencionales o de volumen elevado o en sistemas de cultivo de alto rendimiento, tales como matraces en T, Corning HYPERFLASK®, Cell Factories (Nunc), 1-, 2-, 4-, 10 o 40 pilas Tray Cell, y similares.

25 En una realización, las células adherentes derivadas del amnios se cultivan en presencia de un compuesto que actúa para mantener un fenotipo indiferenciado en las células. En una realización específica, el compuesto es una 3,4-dihidropiridimol[4,5-d]pirimidina sustituida. En una realización más específica, el compuesto es un compuesto que tiene la siguiente estructura química:

30



El compuesto puede ponerse en contacto con una célula adherente derivada del amnios, o una población de dichas células, a una concentración de, por ejemplo, entre aproximadamente $1 \mu\text{M}$ a aproximadamente $10 \mu\text{M}$.

35

5.5.2 Expansión y proliferación de células adherentes derivadas del amnios

Una vez que se separa una célula adherente aislada derivada del amnios o una población aislada de dichas células (por ejemplo, células adherentes derivadas del amnios o una población de dichas células separada de al menos un 50 % de las células del amnios con las que la célula o población de células se asocia normalmente *in vivo*), las células pueden hacerse proliferar y expandirse *in vitro*. Por ejemplo, una población de células adherentes o células adherentes derivadas del amnios puede cultivarse en recipientes de cultivo de tejidos, por ejemplo, placas, matraces, placas multipocillos, o similares, durante un tiempo suficiente para que las células proliferen hasta un 40-70 % de confluencia, es decir, hasta que las células y su descendencia ocupen el 40-70 % del área superficial del cultivo del recipiente del cultivo de tejidos.

Las células adherentes derivadas del amnios pueden sembrarse en recipientes de cultivo a una densidad que permite el crecimiento de las células. Por ejemplo, las células pueden sembrarse a una densidad baja (por ejemplo, aproximadamente 400 a aproximadamente 6.000 células/cm²) a una densidad alta (por ejemplo, aproximadamente 20.000 o más células/cm²). En una realización preferida, las células se cultivan de aproximadamente 0 % a aproximadamente 5 % en volumen de CO₂ en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 25 % de O₂ en aire, preferentemente aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % de O₂ en aire. Las células se cultivan preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente a aproximadamente 37 °C.

55

Las células se cultivan preferentemente en una estufa incubadora. Durante el cultivo, el medio de cultivo puede ser estático o puede estar agitado, por ejemplo, durante el cultivo usando un biorreactor. Las células adherentes derivadas

del amnios se hacen crecer preferentemente en estrés oxidativo bajo (por ejemplo, con adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína, o similares).

5 Aunque las células angiogénicas derivadas del amnios pueden hacerse crecer hasta confluencia, las células no se hacen crecer preferentemente hasta confluencia. Por ejemplo, una vez que se obtiene un 40 %-70 % de confluencia, se pueden pasar las células. Por ejemplo, las células pueden tratarse enzimáticamente, por ejemplo, tripsinizarse, utilizando técnicas bien conocidas en la materia, para separarlas de la superficie del cultivo de tejidos. Tras retirar las células pipeteando y contando las células, aproximadamente 20.000-100.000 células, preferentemente aproximadamente 50.000 células, o aproximadamente 400 a aproximadamente 6.000 células/cm², pueden pasarse a un nuevo recipiente de cultivo que contiene medio de cultivo reciente. Normalmente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio a partir del cual las células se retiraron. Las células adherentes derivadas del amnios se pueden pasar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces, o más. Las AMDAC pueden duplicarse en cultivo al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o al menos 50 veces, o más.

15

5.6 CONSERVACIÓN DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

Las células adherentes derivadas del amnios pueden conservarse, es decir, colocarse en condiciones que permitan el almacenamiento prolongado, o condiciones que inhiban la muerte celular mediante, por ejemplo, apoptosis o necrosis, por ejemplo, durante la recogida o antes de la producción de las composiciones descritas en el presente documento, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en el presente documento.

20

las células adherentes derivadas del amnios pueden conservarse utilizando, por ejemplo, una composición que comprende un inhibidor de la apoptosis, un inhibidor de la necrosis y/o un perfluorocarbono que transporta oxígeno, como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0190042. En una realización, un método para conservar dichas células, o una población de dichas células, comprende poner en contacto dichas células o población de células con una composición de recogida de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono que transporta oxígeno, en el que dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células, en comparación con una población de células que no se ha puesto en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de la caspasa. En otra realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de JNK. En una realización más específica, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación o la proliferación de las células adherentes derivadas del amnios. En otra realización, dicha composición de recogida de células comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dichos perfluorocarbono que transporta oxígeno en fases separadas. En otra realización, dicha composición de recogida de células comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono que transporta oxígeno en una emulsión. En otra realización, la composición de recogida de células comprende adicionalmente un emulsionante, por ejemplo, lecitina. En otra realización, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 25 °C en el momento de ponerse en contacto con las células. En otra realización más específica, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 2 °C y 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 5 °C, en el momento de ponerse en contacto las células. En otra realización más específica, dicha puesta en contacto se lleva a cabo durante el transporte de dicha población de células. En otra realización más específica, dicha puesta en contacto se lleva a cabo durante la congelación y la descongelación de dicha población de células.

45

Las poblaciones de células adherentes derivadas del amnios pueden conservarse, por ejemplo, mediante un método que comprende poner en contacto una población de dichas células con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto conservador de órganos, en el que dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células, en comparación con una población de células que no se ha puesto en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, el compuesto conservador de órganos es una solución UW descrita en la patente de Estados Unidos n.º 4.798.824; también conocido como ViaSpan; Véase también Southard et al., *Transplantation* 49(2):251-257 (1990)) o una solución descrita en Stern et al., patente de Estados Unidos n.º 5.552.267. En otra realización, dicho compuesto conservador de órganos es hidroxietil almidón, ácido lactobiónico, rafinosa, o una combinación de los mismos. En otra realización, la composición de recogida de células comprende adicionalmente un perfluorocarbono que transporta oxígeno, tanto en dos fases o como en una emulsión.

55

En otra realización del método, las células adherentes derivadas del amnios se ponen en contacto con una composición de recogida de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono que transporta oxígeno, un compuesto conservador de órganos, o una combinación de los mismos, durante la perfusión. En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios se ponen en contacto con dicha composición de recogida de células durante un proceso de alteración del tejido, por ejemplo, digestión enzimática del tejido amniótico. En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios se ponen en contacto con dicho compuesto de recogida de células después de la recogida por alteración del tejido, por ejemplo, digestión enzimática del tejido amniótico.

65

Normalmente, durante la recogida de las células adherentes derivadas del amnios, es preferible el enriquecimiento y

el aislamiento para minimizar o eliminar el estrés celular debido a hipoxia y el estrés mecánico. En otra realización del método, por lo tanto, una célula adherente derivada del amnios, o la población de células que comprende las células adherentes derivadas del amnios, se expone a una condición hipóxica durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, en el que una condición hipóxica es una concentración de oxígeno, es decir, por ejemplo, menos de la concentración normal de oxígeno atmosférico; menos de la concentración normal de oxígeno en sangre; o similares. En una realización más específica, dichas células o población de dichas células se expone a dicha condición hipóxica durante menos de dos horas durante dicha conservación. En otra realización más específica, dichas células o población de dichas células se expone a dicha condición hipóxica durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no se expone a una condición hipóxica, durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento. En otra realización específica, dicha población de células no se expone a estrés por cizallamiento durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento.

Las células adherentes derivadas del amnios pueden crioconservarse, en general o mediante métodos específicos divulgados en el presente documento, por ejemplo, en medio de crioconservación en recipientes pequeños, por ejemplo, ampollas. Un medio de crioconservación adecuado incluye, aunque no de forma limitativa, medio de cultivo que incluye, por ejemplo, medio de crecimiento, o medio de congelación celular, por ejemplo, medio de congelación celular comercialmente disponible, por ejemplo, medio de congelación celular identificado mediante los números de catálogo de SigmaAldrich C2695, C2639 (medio de congelación celular exento de suero IX, no contiene DMSO) o C6039 Medio de congelación celular-Glicerol 1 X que contiene Medio esencial mínimo, glicerol, suero de ternera y suero de bovino), 2x Medio Lonza PROFREEZE™, metilcelulosa, dextrano, seroalbúmina humana, suero de feto de bovino, suero de feto de ternera, o Plasmalyte. Medio de crioconservación que comprende preferentemente DMSO (dimetilsulfóxido) o glicerol, a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente 5 % a 10 % (v/v), que incluye opcionalmente suero de feto de bovino o suero humano. El medio de crioconservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las células adherentes aisladas derivadas del amnios se enfrían preferentemente a aproximadamente 1 °C/min durante la crioconservación. Una temperatura de crioconservación preferida es aproximadamente -80 °C a aproximadamente -180 °C, preferentemente aproximadamente -125 °C a aproximadamente -140 °C. Las células crioconservadas se pueden transferir a fase vapor de nitrógeno líquido antes de la descongelación para su uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -80 °C, se transfieren a un área de almacenamiento en nitrógeno líquido. La crioconservación puede también llevarse a cabo usando un congelador de velocidad controlada. Las células crioconservadas se descongelan preferentemente a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

5.7 PRODUCCIÓN DE UN BANCO DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

Las células adherentes derivadas del amnios pueden cultivarse de numerosas maneras diferentes para producir un conjunto de lotes, por ejemplo, un conjunto de dosis administrables individualmente, de dichas células. Conjuntos de lotes de células amnióticas angiogénicas, obtenidos de una pluralidad de placentas, pueden disponerse en un banco de células para, por ejemplo, el almacenamiento prolongado. Generalmente, las células adherentes derivadas del amnios se obtienen de un cultivo inicial de células para formar un cultivo de siembra, que se expande en condiciones controladas para formar poblaciones de células de aproximadamente números equivalentes de duplicaciones. Los lotes se derivan preferentemente del tejido de una única placenta, pero pueden derivarse del tejido de una pluralidad de placentas.

En una realización no limitante, los lotes o dosis de las células adherentes derivadas del amnios se obtienen del siguiente modo. En primer lugar, se altera el tejido amniótico, por ejemplo, se digiere como se ha descrito en la Sección 5.4.3, antes de usar las digestiones con la tripsina y la colagenasa en serie. Las células procedentes del tejido digerido con colagenasa se cultivan, por ejemplo, durante aproximadamente 1-3 semanas, preferentemente aproximadamente 2 semanas. Tras la retirada de las células no adherentes, se recogen las colonias de alta densidad que forman, por ejemplo, mediante tripsinización. Estas células se recogen y se resuspenden en un volumen conveniente de medio de cultivo, y se definen como las células del Paso 0.

Las células del Paso 0 pueden a continuación usarse para los cultivos de expansión de las siembras. Los cultivos de expansión pueden ser cualquier disposición de aparatos de cultivo de células separados, por ejemplo, u Cell Factory mediante NUNC™. Las células en el cultivo del Paso 0 pueden subdividirse en cualquier grado con el fin de sembrar los cultivos de expansión con, por ejemplo, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , o 10×10^4 células adherentes. Preferentemente, entre aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 3×10^4 células del Paso 0 se usan para sembrar cada cultivo de expansión. El número de cultivos de expansión puede depender del número de células del Paso 0 y puede ser mayor o menor en número dependiendo de la(s) placenta(s) concreta(s) de la(las) cual(es) se obtiene(n) las células adherentes.

A continuación, los cultivos de expansión pueden hacerse crecer hasta que la densidad de células en cultivo alcanza un determinado valor, por ejemplo, aproximadamente 1×10^5 células/cm². Las células pueden tanto recogerse y crioconservarse en este punto, o pasarse a nuevos cultivos de expansión como se ha descrito anteriormente. Las células pueden pasarse, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces antes del

uso. Un registro del número acumulativo de duplicaciones de la población se mantiene preferentemente durante la expansión del(de los) cultivo(s). Las células procedentes de un cultivo del Paso 0 pueden expandirse durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 duplicaciones, o hasta 60 duplicaciones. Preferentemente, sin embargo, el número de duplicaciones de la población, antes de dividirse la población de células en dosis individuales, está entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 duplicaciones. Las células pueden cultivarse de forma continua mediante el proceso de expansión, o pueden congelarse en uno o más puntos durante la expansión.

Las células que se van a usar para las dosis individuales pueden congelarse, por ejemplo, criopreservarse para un uso posterior. Las dosis individuales pueden comprender, por ejemplo, aproximadamente 1 millón a aproximadamente 50 millones de células por ml, y pueden comprender entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^{10} células en total.

Por tanto, puede prepararse un banco de células que comprende células adherentes derivadas del amnios mediante un método que comprende: expandir células adherentes derivadas del amnios de un cultivo primario procedentes de una placenta post-parto humana para una primera pluralidad de duplicaciones de la población; criopreservando las células para formar un Banco de células maestras; expandiendo opcionalmente una pluralidad de las células del Banco de células maestras para una segunda pluralidad de duplicaciones de la población; criopreservando las células expandidas para formar un Banco de células de trabajo; expandiendo opcionalmente una pluralidad de las células adherentes derivadas del amnios expandidas procedentes del Banco de células de trabajo para una tercera pluralidad de duplicaciones de la población; y criopreservando las células expandidas resultantes en dosis individuales, en el que dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células. El banco puede comprender dosis, o lotes, o únicamente células adherentes derivadas del amnios, o puede comprender una combinación de lotes de células adherentes derivadas del amnios y lotes o dosis de otro tipo de células, por ejemplo, otro tipo de citoblasto o célula progenitora. Preferentemente, cada dosis individual comprende solo células adherentes derivadas del amnios. En otra realización específica, todas de dichas células en dicho cultivo primario son de la misma placenta. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden entre aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^5 células. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden entre aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 células. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden entre aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 células. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden entre aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 células. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden entre aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^9 células. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden entre aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} células.

En determinadas realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios se pueden descongelar a partir de un Banco de células de trabajo y cultivarse para una pluralidad de duplicaciones de la población. Cuando se genera un número deseado de células, o ha tenido lugar un número deseado de duplicaciones de la población, se pueden recoger las células adherentes, por ejemplo, mediante centrifugación, y resuspenderse en una solución que comprende, por ejemplo, dextrano, por ejemplo, dextrano al 5 %. En determinadas realizaciones, el dextrano es dextrano-40. En determinadas realizaciones, las células se recogen una segunda vez y se resuspenden en una solución que comprende dextrano y un criopreservante, por ejemplo, un solución de dextrano al 5 % (por ejemplo, dextrano-40) que comprende HSA al 10 % y 2 %-20 %, por ejemplo, DMSO al 5 %, y criopreservado. Las células adherentes derivadas del amnios criopreservadas pueden descongelarse, por ejemplo, inmediatamente antes de su uso.

En una realización preferida, la donante a partir de la cual se obtiene la placenta (por ejemplo, la madre) se prueba para al menos un patógeno. En determinadas realizaciones, si la madre da positivo para un patógeno probado, se descarta el lote completo procedente de la placenta. Dicho ensayo se puede llevar a cabo en cualquier momento durante la producción de lotes de células adherentes derivadas del amnios, incluyendo antes o después del establecimiento de las células del Paso 0 durante el cultivo de expansión. Los patógenos para los cuales se ensaya la presencia pueden incluir, sin limitación, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, virus de la inmunodeficiencia humana (tipos I y II), citomegalovirus, herpesvirus, y similares.

5.8 USOS DE LAS CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS

Se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden células adherentes derivadas del amnios. Los ejemplos de dichas composiciones incluyen composiciones farmacéuticas (véase la Sección 5.8.1 siguiente); matrices y estructuras principales (véase la Sección 5.8.2 siguiente), y medios acondicionados para células adherentes derivadas del amnios (véase la Sección 5.8.3., siguiente).

5.8.1 Composiciones que comprenden células adherentes derivadas del amnios

En determinados aspectos, las células adherentes derivadas del amnios están contenidas en, o son componentes de, una composición farmacéutica. Las células pueden prepararse de tal forma que sean fácilmente administrables a un individuo, por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios que están contenidas en un recipiente que es adecuado para el uso médico. Dicho recipiente puede ser, por ejemplo, una jeringa, una bolsa de plástico estéril, un matraz, un frasco, u otro recipiente a partir del cual puede dispensarse fácilmente una población de células

angiogénicas derivadas del amnios. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otro plástico, una bolsa médicamente aceptable adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El recipiente es uno que permite la crioconservación de las células. Las células en las composiciones, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas, pueden comprender las células adherentes derivadas del amnios de único donante, o de múltiples donantes. Las células pueden emparejarse completamente con HLA en un receptor previsto, o desemparejarse parcial o completamente con HLA.

Por tanto, las células adherentes derivadas del amnios en las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden administrarse a un individuo que lo necesita en la forma de una composición que comprende células adherentes derivadas del amnios en un recipiente. En una realización, el recipiente es una bolsa, matraz, o frasco. En una realización más específica, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. En otra realización, dicha bolsa es adecuada para, permitir o facilitar la administración intravenosa de dichas células adherentes, por ejemplo, mediante infusión intravenosa, inyección en bolo, o similares. La bolsa puede comprender múltiples luces o compartimentos que están interconectados para permitir mezclar las células y una o más soluciones diferentes, por ejemplo, un fármaco, antes, o durante, la administración. En otra realización, antes de la crioconservación, la solución que comprende las células adherentes derivadas del amnios comprende uno o más compuestos que facilitan la crioconservación de las células. En otra realización específica, dichas células adherente derivadas del amnios están contenidas en una solución acuosa fisiológicamente aceptable. En una realización más específica, dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable es una solución de NaCl al 0,9 %. En otra realización específica, dichas células adherentes derivadas del amnios comprenden células placentarias que se emparejan con HLA en un receptor de dichas células. En otra realización específica, dichas células adherentes derivadas del amnios se derivan de una pluralidad de donantes. En diversas realizaciones específicas, dicho recipiente comprende aproximadamente, al menos, o a lo sumo 1×10^6 de dichas células, 5×10^6 de dichas células, 1×10^7 de dichas células madre, 5×10^7 de dichas células, 1×10^8 de dichas células, 5×10^8 de dichas células, 1×10^9 de dichas células, 5×10^9 de dichas células, o 1×10^{10} de dichas células. En otras realizaciones específicas de cualquiera de las anteriores poblaciones crioconservadas, dichas células se han pasado aproximadamente, al menos, o no más de 5 veces, no más de 10 veces, no más de 15 veces, o no más de 20 veces. En otra realización específica de cualquiera de las anteriores células crioconservadas, dichas células se han expandido en dicho recipiente. En realizaciones específicas, una dosis unitaria única de células adherentes derivadas del amnios puede comprender, en diversas realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células adherentes derivadas del amnios.

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

5.8.2 Matrices que comprende células adherentes derivadas del amnios

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

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

Las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento pueden sembrarse sobre un matriz natural, por ejemplo, un biomaterial placentario tal como un material de membrana amniótica. Dicho material de membrana amniótica puede ser, por ejemplo, una membrana amniótica diseccionada directamente de una placenta de mamífero; una membrana amniótica fijada o tratada térmicamente, una membrana amniótica prácticamente seca (es decir, <20 % de H_2O), una membrana coriónica, una membrana coriónica prácticamente seca, una membrana amniótica y coriónica prácticamente seca, y similares. Los biomateriales placentarios preferidos sobre los cuales se pueden sembrar las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento pueden sembrarse como se describe en Hariri, Publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 2004/0048796.

En otra realización específica, la matriz es una composición que comprende una matriz extracelular. En una realización

más específica, dicha composición es MATRIGEL™ (BD Biosciences).

La población de células aislada que comprende las células adherentes derivadas del amnios descrita en el presente documento puede suspenderse en una solución de hidrogel adecuada para, por ejemplo, la inyección. El hidrogel es, por ejemplo, un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula mediante enlaces covalentes iónicos, o enlaces de hidrógeno para crear una estructura de red cristalina abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Los hidrogeles adecuados para dichas composiciones incluyen péptidos autoensamblantes, tales como RAD16. En una realización, una solución de hidrogel que comprende las células puede dejarse endurecer, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tiene células dispersas en la anterior para el implante. Las células adherentes derivadas del amnios en dicha matriz pueden también cultivarse con el fin de que las células se expandan mitóticamente, por ejemplo, antes del implante. Los materiales formadores de hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y las sales de los mismos, péptidos, polifosfazinas, y poliacrilatos, que están reticulados iónicamente, o en polímeros en bloque tales como copolímeros en bloque de óxido de polietileno-propilenglicol que se reticulan mediante temperatura o pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o matriz es biodegradable.

En determinadas realizaciones, las composiciones que comprenden la población de células, proporcionadas en el presente documento, comprenden un gel polimerizable *in situ* (véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2002/0022676; Anseth et al., J. Control Release, 78(1-3):199-209 (2002); Wang et al., Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003). En algunas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas, o soluciones alcohólicas acuosas, que tienen grupos secundarios cargados, o una sal iónica de las mismas. Los ejemplos de polímeros que tienen grupos secundarios ácidos que se pueden hacer reaccionar con cationes son los poli(fosfazenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo), y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. Se pueden usar también copolímeros que tienen grupos secundarios ácidos formados mediante reacción del ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de éter de vinilo. Los ejemplos de grupos ácidos son grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos de alcoholes halogenados (preferentemente fluorados), grupos OH fenólicos, y grupos OH ácidos.

En una realización específica, la matriz es un fieltro, que puede estar compuesta por un hilo de multifilamentos fabricado a partir de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL, o ácido hialurónico. El hilo se fabrica en un fieltro usando técnicas de procesamiento textil convencionales que consisten en un engastado, corte, cardado y punzonado. En otra realización preferida, la población de células de la invención se siembra sobre estructuras principales de espuma que pueden ser estructuras de material compuesto. Además, el marco tridimensional puede moldearse en una forma útil, tal como una estructura específica en el cuerpo que se va a reparar, sustituir, o aumentar. Otros ejemplos de estructuras principales incluyen esteras no tejidas, espumas porosas, o péptidos autoensamblantes. Las esteras no tejidas pueden formarse usando fibras comprendidas por un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (por ejemplo, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Las espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímeros de poli(ε-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formados mediante procesos tales como criodesecación, o liofilización (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 6.355.699) pueden también usarse como estructuras principales.

Las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento pueden sembrarse sobre un marco o estructura principal tridimensional e implantarse *in vivo*. Dicho marco puede implantarse en combinación con uno cualquiera o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que, por ejemplo, estimulan la formación de tejido, por ejemplo, la formación de hueso o la formación de vasculatura.

Las células adherentes derivadas del amnios placentario proporcionadas en el presente documento pueden, en otra realización, sembrarse sobre estructuras principales de espuma que pueden ser estructuras de material compuesto. Dichas estructuras principales de espuma pueden moldearse en una forma útil, de tal manera que una parte de una estructura específica en el cuerpo se va a reparar, sustituir o aumentar. En algunas realizaciones, el marco se trata, por ejemplo, con ácido acético 0,1 M seguido por incubación en polilisina, PBS, y/o colágeno, antes de la inoculación de las células a fin de potenciar la unión celular. Las superficies externas de la matriz pueden modificarse para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como revistiendo con plasma la matriz, o la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glucoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de dermatán, sulfato de queratina, etc.), una matriz celular, y/u otros materiales tales como, aunque no de forma limitativa, gelatina, alginatos, agar, agarosa, y gomas vegetales, y similares.

En algunas realizaciones, la matriz comprende, o se trata con, materiales que la vuelven no trombogénica. Estos tratamientos y materiales pueden promover y sostener también el crecimiento endotelial, la migración, y la deposición de la matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, aunque no de forma limitativa, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno de Tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE y siliconas de poliuretano segmentadas, tales como PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). La matriz puede comprender también agentes antitrombóticos tales como heparina; las estructuras principales pueden tratarse también para alterar la carga superficial (por ejemplo, el revestimiento con plasma) antes de la siembra con las células adherentes proporcionadas en el presente documento.

El marco puede tratarse antes de la inoculación de las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento a fin de potenciar la unión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación con la población de células de la invención, podrían tratarse matrices de nailon con ácido acético 0,1 M, y e incubarse en polilisina, PBS, y/o colágeno para revestir el nailon. El poliestireno puede tratarse de forma similar usando ácido sulfúrico.

Además, las superficies externas del marco tridimensional pueden modificarse para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como mediante revistiendo con plasma el marco o mediante la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glucoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de dermatán, sulfato de queratina), una matriz celular, y/u otros materiales tales como, aunque no de forma limitativa, gelatina, alginatos, agar, agarosa, o gomas vegetales.

En algunas realizaciones, la matriz comprende o se trata con materiales que vuelven la matriz no trombogénica, por ejemplo, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno de Tipo IV, colágeno, y materiales sintéticos tales como EPTFE o siliconas de poliuretano urea segmentadas, tales como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). Dichos materiales pueden tratarse adicionalmente para volver la estructura principal no trombogénica, por ejemplo, con heparina, y tratamientos que alteran la carga superficial del material, tal como revestimiento con plasma.

Pueden también proporcionarse composiciones de células terapéuticas que comprenden la población de células de la invención comprenden células adherentes derivadas del amnios en la forma de un complejo de matriz-célula. Las matrices pueden incluir estructuras principales biocompatibles, redes cristalinas, estructuras autoensamblantes, y similares, tanto bioabsorbibles como no, líquidos, geles, o sólidos. Dichas matrices son conocidas en las técnicas del tratamiento de células terapéuticas, reparaciones quirúrgicas, ingeniería de tejidos, y cicatrización de heridas. En determinadas realizaciones, las células se adhieren a la matriz. En otras realizaciones, las células se atrapan contienen en espacios de la matriz. Más preferidos son aquellos complejos de matriz-célula en los que las células crecen en estrecha asociación con la matriz, y cuando se usan terapéuticamente, estimulan y apoyan el crecimiento interno de las células de un receptor, o estimulan o apoyan la angiogénesis. Las composiciones de matriz-célula pueden introducirse en el cuerpo de un individuo de cualquier manera conocida en la técnica, incluyendo, aunque no de forma limitativa el implante, la inyección, la unión quirúrgica, el trasplante con otro tejido, una inyección y similares. En algunas realizaciones, las matrices se forman *in vivo*, o *in situ*. Por ejemplo, se pueden usar geles polimerizables *in situ* de acuerdo con la invención. Ejemplos de dichos geles son conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, la población de células proporcionadas en el presente documento se siembran sobre matrices tridimensionales, tales como estructuras principales y se implantan *in vivo*, donde las células sembradas pueden proliferar sobre o en el marco o ayudan a establecer un tejido de sustitución *in vivo* con o sin la cooperación de otras células. El crecimiento de las células adherentes derivadas del amnios o los cultivos simultáneos de las mismas en el marco tridimensional dan como resultado preferentemente la formación de un tejido tridimensional, o una base del mismo, que se puede utilizar *in vivo*, por ejemplo, para la reparación del tejido dañado o enfermo. Por ejemplo, las estructuras tridimensionales principales pueden usarse para formar estructuras tubulares, por ejemplo, para su uso en la reparación de vasos sanguíneos; o elementos del sistema circulatorio o estructuras coronarias. De acuerdo con un aspecto de la invención, la población de células de la invención que comprenden las células adherentes derivadas del amnios, o los cultivos simultáneos de las mismas, se inoculan, o se siembran en un marco o matriz tridimensional, tal como una estructura principal, una espuma o un hidrogel. El marco puede configurarse de diversas formas tales como generalmente plano, generalmente cilíndrico o tubular, o puede ser una forma completamente libre según puede requerirse o desearse para la estructura correctiva en consideración. En algunas realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios crecen en una estructura tridimensional, mientras que, en otras realizaciones, las células solo sobreviven, o incluso mueren, pero estimulan o promueven el crecimiento interno de nuevo tejido o vascularización en un receptor.

Las células de la población de células de la invención pueden crecer libremente en cultivo, retirarse del cultivo e inocularse sobre un marco tridimensional. La inoculación del marco tridimensional con una concentración de células, por ejemplo, aproximadamente 10^6 a 5×10^7 células por mililitro, da como resultado preferentemente el establecimiento del soporte tridimensional en periodos de tiempo relativamente más cortos. dará como resultado el establecimiento del soporte del estroma tridimensional en cortos periodos de tiempo. Además, en alguna aplicación puede ser preferible usar mayor o menor de células dependiendo del resultado deseado.

En una realización específica, la matriz puede cortarse en una tira (por ejemplo, con una forma rectangular) de la cual la anchura es aproximadamente igual a la circunferencia interna de un órgano tubular en el que se insertará en última instancia. Las células adherentes derivadas del amnios pueden inocularse sobre la estructura principal e incubarse mediante flotación so suspensión en medio líquido. En la etapa adecuada de confluencia, la proteína principal puede enrollarse en un tubo uniendo los bordes largos juntos. A continuación, la costura puede cerrarse suturando los dos bordes juntos usando fibras de un material adecuado de un diámetro apropiado. A fin de evitar que las células ocluyan la luz, uno de los extremos abierto del marco tubular puede fijarse a una boquilla. El medio líquido puede forzarse a través de la boquilla desde una cámara fuente conectada a la cámara de incubación para crear una corriente a través

del interior del marco tubular. El otro extremo abierto puede prefijarse en una apertura de salida que conduce a una cámara de recogida a partir de la cual el medio puede hacerse recircular a través de la cámara de la fuente. El tubo puede desunirse de la boquilla y la apertura de salida cuando se completa la incubación. Véase, por ejemplo, la solicitud internacional n.º WO 94/25584.

5 En general, se pueden combinar dos marcos tridimensionales en un tubo usando cualquiera de los siguientes métodos. Dos o más marcos planos se pueden colocar encima de otro y suturarse juntos. la lámina de dos capas resultante puede a continuación enrollarse, y, como se ha descrito anteriormente, unirse junta y asegurarse. En determinadas realizaciones, una estructura principal tubular que va a servir como la capa interna puede inocularse con las células adherentes derivadas del amnios e incubarse. Una segunda estructura principal puede hacerse crecer como una tira plana con una anchura ligeramente más grande que la circunferencia externa del marco tubular. tras alcanzar el crecimiento adecuado, el marco plano se envuelve alrededor de la parte exterior de la estructura principal tubular seguido por el cierre de la costura de los dos bordes del marco plano y asegura el marco plano al tubo interno. En otra realización, dos o más mallas tubulares de diámetros ligeramente diferentes pueden hacerse crecer por separado. El marco con el diámetro más pequeño puede insertarse en el interior de uno más grande y asegurarse. Para cada uno de estos métodos, se pueden añadir más capas volviendo a aplicar el método al tubo de doble capa. Las estructuras principales pueden combinarse en cualquier etapa del crecimiento de las células adherentes derivadas del amnios, y la incubación de las estructuras principales combinadas puede continuarse cuando sea deseable.

20 De acuerdo con lo anterior, las células y composiciones terapéuticas proporcionadas en el presente documento pueden utilizarse junto con los dispositivos implantables. Por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios pueden coadministrarse con, por ejemplo, endoprótesis vasculares, válvulas artificiales, dispositivos de ayuda ventricular, Bobinas desmontables de Guglielmi y similares. Como los dispositivos pueden constituir la terapia dominante proporcionada a un individuo que necesita dicha terapia, las células y similares se pueden usar como terapia de soporte o secundaria para ayudar, estimular, o promover la cicatrización adecuada en el área del dispositivo implantado. La población de células y las composiciones terapéuticas de la invención pueden utilizarse también para pretratar determinados dispositivos implantables, para minimizar problemas cuando se usan *in vivo*. Dichos dispositivos pretratados, incluyendo los dispositivos revestidos, pueden tolerarse mejor por los pacientes que los reciben, con una disminución del riesgo de infección local o sistémica, o por ejemplo, restenosis u oclusión adicional de los vasos sanguíneos.

5.8.3 Medio acondicionado para células adherentes derivadas del amnios

35 Se divulga además en el presente documento un medio que se ha acondicionado para las células adherentes derivadas del amnios, es decir, un medio que comprende una o más biomoléculas secretadas o excretadas por las células adherentes. En diversos ejemplos, el medio acondicionado comprende medio en el que las células han crecido durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días, o durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 duplicaciones de la población, o más. En otros ejemplos, el medio acondicionado comprende medio en el que las células adherentes derivadas del amnios hasta al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 40 70 %, 80 %, 90 % de confluencia, o hasta un 100 % de confluencia. Dicho medio acondicionado puede usarse para soportar el cultivo de una población de células, por ejemplo, células madre, por ejemplo, células madre placentarias, embriocitoblastos, células germinales embrionarias, células madre adultas o similares. En otro ejemplo, el medio acondicionado comprende medio en el que las células adherentes derivadas del amnios, y las células que no son células adherentes derivadas del amnios, se han cultivado juntas.

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

5.9 CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIOS MODIFICADAS

5.9.1 Células adherentes derivadas del amnios modificadas genéticamente

55 En otro aspecto, las células adherentes derivadas del amnios descritas en el presente documento pueden modificarse genéticamente, por ejemplo, para producir un ácido nucleico o polipéptido de interés, o para producir una célula diferenciada, por ejemplo, una célula osteogénica, una célula miocítica, una célula pericítica, o una célula angiogénica, que producen un ácido nucleico o polipéptido de interés. Por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios pueden modificarse para producir factores angiogénicos, tales como moléculas proangiogénicas, factores y receptores solubles o moléculas promigratorias tales como quimioquinas, por ejemplo, factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1) o receptores de la quimioquina. Se puede llevar a cabo la modificación genética, por ejemplo, usando vectores basados en virus que incluyen, aunque no de forma limitativa, vectores de replicación no integrantes, por ejemplo, vectores del virus del papiloma, vectores del SV40, vectores adenovíricos; vectores víricos integrantes, por ejemplo, vector de retrovirus, o vectores de virus adenoasociados; o vectores víricos defectivos para la replicación. Otros métodos de introducir ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, un cañón de partículas, 65 inyección directa de ADN, o similares.

Las células adherentes divulgadas en el presente documento pueden estar, por ejemplo, transformadas o transfectadas con ADN controlado por o en asociación operativa con, uno o más elementos de control de la expresión adecuados, por ejemplo, secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, sitios internos de entrada al ribosoma. Preferentemente, dicho ADN incorpora un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, las células adherentes diseñadas mediante ingeniería genética pueden estar, por ejemplo, creciendo en medio enriquecido y a continuación se cambian a medio selectivo. En un aspecto, el ADN usado para diseñar mediante ingeniería genética una célula adherentes derivada del amnios comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés, por ejemplo, una citoquina, factor de crecimiento, agente de diferenciación, o polipéptido terapéutica.

El ADN utilizado para diseñar mediante ingeniería genética, la célula adherente puede comprender cualquier promotor conocido en la técnica para impulsar la expresión de una secuencia de nucleótidos en células de mamífero, por ejemplo, células humanas. Por ejemplo, los promotores incluyen, aunque no de forma limitativa, el promotor/potenciador del CMV, el promotor del SV40, el promotor del papilomavirus, el promotor del virus de Epstein-Barr, el promotor del gen de la elastina, y similares. En un aspecto, el promotor es regulable, de tal manera que la secuencia del nucleótido se expresa solo cuando se desea. Los promotores pueden ser tanto inducibles (por ejemplo, aquellos asociados con la metalotioneína y las proteínas de choque térmico) como constitutivos.

En otro aspecto, el promotor es específico de tejidos o presenta especificidad de tejidos. Los ejemplos de dichos promotores incluyen, aunque no de forma limitativa, la región de control del gen de la cadena-2 ligera de miosina (Shani, 1985, Nature 314:283) (músculo esquelético).

Las células adherentes derivadas del amnios divulgadas en el presente documento pueden diseñarse mediante ingeniería genética o seleccionarse de otra forma para "inactivar" o "desactivar" la expresión de uno o más genes en dichas células. Se puede hacer disminuir la expresión de un gen nativo en una célula mediante, por ejemplo, la inhibición de la expresión inactivando el gen completamente mediante, por ejemplo, recombinación homóloga. En un aspecto, por ejemplo, un exón que codifica una región importante de la proteína, o un exón 5' en esta región, se interrumpe mediante un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, evitando la producción de ARNm normal procedente del gen diana y que da como resultado la inactivación del gen. Un gen puede también inactivarse creando una deleción en parte de un gen o mediante una deleción del gen completo. Utilizando una construcción con dos regiones de homología en el gen diana que están muy separadas en el genoma, las secuencias que intervienen las dos regiones puede someterse a deleción (Mombaerts et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084). Se pueden usar también el ARN de horquilla corta de sentido contrario: morfolinós, las ADNzimas, ARN interferente pequeño (ARNip), y las moléculas de ribozima que inhiben la expresión del gen diana para reducir el nivel de actividad del gen diana en las células adherentes. Por ejemplo, las moléculas de ARN de sentido contrario que inhiben la expresión de los complejos del gen de histocompatibilidad mayor (HLA) han mostrado ser más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Se pueden utilizar moléculas de triple hélice para reducir el nivel de actividad del gen diana. Véase, por ejemplo, L. G. Davis et al. (eds), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn.

Por ejemplo, las células adherentes derivadas del amnios divulgadas en el presente documento pueden modificarse genéticamente con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés, en la que la expresión del polipéptido de interés es controlable mediante un factor exógeno, por ejemplo, un polipéptido, una molécula orgánica pequeña, o similar. El polipéptido de interés puede ser un polipéptido terapéutico. En un ejemplo más específico, el polipéptido de interés es IL-12 o el antagonista del receptor de la interleuquina-1 (IL-1Ra). En otro ejemplo, el polipéptido de interés es una fusión del antagonista del receptor de la interleuquina-1 y la dihidrofolato reductasa (DHFR), y el factor exógeno es un antifolato, por ejemplo, metotrexato. Dicha construcción es útil en el diseño mediante ingeniería genética de las células adherentes derivadas del amnios que expresan IL-1Ra, o una fusión de IL-1Ra y DHFR, tras entrar en contacto con el metotrexato. Dicha construcción se puede usar, por ejemplo, en el tratamiento de la artritis reumatoide. En este caso, la fusión de IL-1Ra y DHFR está regulada de forma traduccional tras la exposición a un antifolato tal como metotrexato. Por tanto, en otro ejemplo, el ácido nucleico usado para diseñar mediante ingeniería genética una célula adherente derivada del amnios puede comprender secuencias de nucleótidos que codifican un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en las que dicho primer y segundo polipéptidos se expresan como una proteína de fusión que está regulada por exceso traduccionalmente en presencia de un factor exógeno. El polipéptido puede expresarse transitoriamente o de forma prolongada (por ejemplo, en el curso de semanas o meses). Dicha molécula de ácido nucleico puede comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que codifica un polinucleótido que permite la selección positiva de células diseñadas mediante ingeniería genética, o permite la visualización de las células diseñadas mediante ingeniería genética. En otro ejemplo más específico, la secuencia de nucleótidos codifica un polinucleótido que es, por ejemplo, fluorescente en las condiciones de visualización adecuadas, por ejemplo, la luciferasa (Luc). En un ejemplo más específico, dicha molécula de ácido nucleico puede comprender IL-1Ra-DHFR-IRES-Luc, donde IL-1Ra es un antagonista del receptor de la interleuquina-1, IRES es un sitio interno de entrada al ribosoma, y DHFR es dihidrofolato reductasa.

5.9.2 Líneas de células adherentes derivadas del amnios inmortalizadas

Las células adherentes derivadas del amnios de mamífero pueden immortalizarse de forma condicional mediante transfección con un vector adecuado que contiene un gen promotor del crecimiento, es decir, un gen que codifica una proteína que, en las condiciones adecuadas, promueve el crecimiento de la célula transfectada, de tal manera que la producción y/o la actividad de la proteína promotora del crecimiento es regulable por un factor externo. En un aspecto preferido, el gen promotor del crecimiento es un oncogén tal como, aunque no de forma limitativa, v-myc, N-myc, c-myc, p53, antígeno T grande de SV40, antígeno T grande del poliovirus, adenovirus E1a o proteína E7 del papilomavirus humano. En otro aspecto, las células adherentes derivadas del amnios pueden immortalizarse utilizando la recombinación cre-lox, como se ilustra para una línea de células β pancreáticas humanas por Narushima, M., et al (Nature Biotechnology, 2005, 23(10):1274-1282).

Se puede conseguir la regulación externa de la proteína promotora del crecimiento colocando el gen promotor del crecimiento bajo el control de un promotor regulable externamente, por ejemplo, un promotor de la actividad que puede controlarse, por ejemplo, modificando la temperatura de las células transfectadas o la composición del medio en contacto con las células. Por ejemplo, puede emplearse un sistema de expresión génica controlado por tetraciclina (tet) (véanse Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, 1992; Hoshimaru et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1518-1523, 1996). En ausencia de tet, un transactivador controlado por tet (tTA) en este vector activa fuertemente la transcripción de $ph_{CMV^{-1}}$, un promotor mínimo del citomegalovirus humano fusionado a secuencias del operador tet, tTA es una proteína de fusión del represor (tetR) del operón de resistencia a tet derivado del transposón-10 de *Escherichia coli* y el dominio ácido de VP16 del virus del herpes simple. concentraciones bajas, no tóxicas de tet (por ejemplo 0,01-1,0 $\mu\text{g/ml}$) eliminan casi completamente la transactivación por tTA.

En un aspecto, el vector contiene además un gen que codifica un marcador seleccionable, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia a fármacos. El gen de resistencia a la neomicina bacteriana (neo^R) es uno de dichos marcadores que pueden emplearse en los métodos actuales. Se pueden seleccionar células que transportan neo^R por medios conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica, tales como la adición de, por ejemplo, 100-200 $\mu\text{g/ml}$ de G418 en el medio de crecimiento.

La transfección puede conseguirse mediante cualquiera de varios medios conocidos por las personas normalmente expertas en la materia incluyendo, aunque no de forma limitativa, la infección retroviral. En general, un cultivo de células puede transfectarse mediante incubación con una mezcla de medio acondicionado recogido a de la línea de células productoras para el vector y DMEM/F12 que contiene suplementos de N2. Por ejemplo, un cultivo de células placentarias preparado como se ha descrito anteriormente puede infectarse después de, por ejemplo, cinco días *in vitro* mediante incubación durante aproximadamente 20 horas en un volumen de medio acondicionado y dos volúmenes de DMEM/F12 que contienen suplementos de N2. Las células transfectadas que transportan un marcador seleccionable pueden a continuación seleccionarse como se ha descrito anteriormente.

Después de la transfección, los cultivos se pasan sobre una superficie que permite la proliferación, por ejemplo, permite que al menos un 30 % de las células se duplique en un periodo de 24 horas. Preferentemente, el sustrato es un sustrato de poliornitina/laminina, que consiste en plástico del cultivo de tejidos revestido con poliornitina (10 $\mu\text{g/ml}$) y/o laminina (10 $\mu\text{g/ml}$), un sustrato de polilisina/laminina o una superficie tratada con fibronectina. Los cultivos a continuación se alimentan cada 3-4 días con medio de crecimiento, que puede estar o no suplementado con uno o más factores potenciadores de la proliferación. Pueden añadirse factores potenciadores de la proliferación al medio de crecimiento cuando los cultivos son menos de un 50 % confluentes.

Las líneas de células adherentes derivadas del amnios immortalizadas condicionalmente se pueden pasar utilizando técnicas convencionales, tales como tripsinización, cuando son un 80-95 % confluentes. Hasta aproximadamente el paso vigésimo, es, en algunas realizaciones, beneficioso mantener la selección (mediante, por ejemplo, la adición de G418 a células que contienen el gen de resistencia a la neomicina). Las células pueden también congelarse en nitrógeno líquido durante un almacenamiento prolongado.

Se pueden aislar líneas de células clonales a partir de líneas de células adherentes immortalizadas condicionalmente preparadas como se ha descrito anteriormente. En general, dichas líneas de células clonales pueden aislarse usando técnicas normalizadas, tales como mediante dilución límite o usando anillos de clonación, y expandirse. Las líneas de células clonales pueden alimentarse generalmente y pasarse como se ha descrito anteriormente.

Las líneas de células adherentes derivadas del amnios immortalizadas condicionalmente, que pueden, pero no necesariamente, ser clonales, pueden inducirse generalmente para diferenciarse suprimiendo la producción y/o la actividad de la proteína promotora del crecimiento en condiciones de cultivo que facilitan la diferenciación. Por ejemplo, si el gen que codifica la proteína promotora del crecimiento está bajo el control de un promotor regulable externamente, las condiciones, por ejemplo, la temperatura o la composición del medio, pueden modificarse para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. Para el sistema de expresión génica controlado por tetraciclina descrito anteriormente, se puede conseguir la diferenciación mediante la adición de tetraciclina para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. En general, 1 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina durante 4-5 días es suficiente para iniciar la diferenciación. Para promover la diferenciación adicional, se pueden incluir agentes adicionales en el medio de crecimiento.

5.10 MÉTODOS DE TRATAMIENTO UTILIZANDO CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIO

5.10.1 Enfermedades del sistema circulatorio

5 Las células adherentes derivadas del amnios, las poblaciones de dichas células, y las poblaciones de células que comprenden las células adherentes derivadas del amnios, proporcionadas en el presente documento, pueden usarse para tratar a individuos que presentan varios estados de enfermedad o dolencias que se beneficiarían de la angiogénesis. Los ejemplos de dichos estados de enfermedad o dolencias incluyen infarto de miocardio, ictus, 10 insuficiencia cardíaca congestiva, arteriopatía periférica, síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, úlcera diabética, úlcera de decúbito, úlcera venosa, úlcera arterial, quemaduras, fractura no unida, pérdida de hueso asociada a tumor, artrosis y reparación del hueso maxilofacial. Las células adherentes aisladas derivadas del amnios, y las poblaciones de dichas células, pueden usarse también para promover la angiogénesis en individuos que presentan pérdida de 15 tejido traumática o para evitar la formación de cicatrices, o en individuos que tienen una sustitución total de la articulación o prótesis dentales.

En una realización más específica, Las células adherentes aisladas derivadas del amnios, y las poblaciones de dichas células, proporcionadas en el presente documento, pueden usarse para tratar un individuo que tiene una insuficiencia 20 del sistema circulatorio, por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad vascular periférica o una arteriopatía de coronarias.

En un aspecto, se proporcionan en el presente documento poblaciones aisladas de células de la invención para su uso en métodos para tratar un paciente con una cardiopatía o lesión que comprenden administrar una composición de 25 células terapéuticas a un paciente con una enfermedad o lesión del corazón o el sistema circulatorio y evaluar al paciente para las mejoras en la función cardíaca, en la que dicha composición comprende dicha población de células que comprende las células adherentes derivadas del amnios como se describe en el presente documento. En una realización, la cardiopatía es una cardiomiopatía. En realizaciones específicas, la cardiomiopatía es tanto idiopática como una cardiomiopatía con una causa conocida. En otras realizaciones específicas, la cardiomiopatía es tanto 30 isquémica como no isquémica en la naturaleza. En otras realizaciones, la enfermedad del corazón o del sistema circulatorio comprende una o más de angioplastia, aneurisma, angina (angina de pecho), estenosis aórtica, aortitis, arritmias, arteriosclerosis, arteritis, hipertrofia asimétrica del septo (ASH), aterosclerosis, fibrilación y aleteo auricular, endocarditis bacteriana, síndrome de Barlow (prolapso de la válvula mitral), bradicardia, enfermedad de Buerger (tromboangiitis obliterans), cardiomegalia, cardiomiopatía, carditis, arteriopatía de carótida, coartación de la aorta, cardiopatías congénitas (defectos cardíacos congénitos), insuficiencia cardíaca congestiva (insuficiencia cardíaca), 35 arteriopatía de coronarias, Síndrome de Eisenmenger, embolia, endocarditis, eritromelalgia, fibrilación, displasia fibromuscular, bloqueo cardíaco, soplo cardíaco, hipertensión, hipotensión, calcificación arterial infantil idiopática, enfermedad de Kawasaki (síndrome de ganglio linfático mucocutáneo, enfermedad de ganglio linfático mucocutáneo, poliarteritis infantil), síndrome metabólico, angina microvascular, infarto de miocardio (ataque al corazón), miocarditis, taquicardia auricular paroxísmica (PAT), periarteritis nodosa (poliarteritis, poliarteritis nodosa), pericarditis, 40 vasculopatía periférica, isquemia de la extremidad crítica, vasculopatía diabética, flebitis, estenosis de la válvula pulmonar (estenosis pulmonar), enfermedad de Raynaud, estenosis de la arteria renal, hipertensión renovascular, enfermedad cardíaca reumática, defectos del septo, isquemia silenciosa, síndrome X, taquicardia, arteritis de Takayasu, Tetralogía de Fallot, transposición de los grandes vasos, atresia tricúspide, tronco arterioso, cardiopatía valvular, úlceras varicosas, varices, vasculitis, defecto ventricular del septo, síndrome de Wolff-Parkinson-White, o defecto del relieve endocárdico. 45

En otras realizaciones, la enfermedad del corazón o del sistema circulatorio comprende una o más de fiebre reumática aguda, pericarditis reumática aguda, endocarditis reumática aguda, miocarditis reumática aguda, cardiopatías reumáticas crónicas, enfermedades de la válvula mitral, estenosis mitral, insuficiencia mitral reumática, enfermedades de 50 de la válvula aórtica, enfermedades de otras estructuras endocárdica, cardiopatía isquémica (aguda y subaguda), angina de pecho, enfermedades de la circulación pulmonar (cardiopatía pulmonar aguda, embolia pulmonar, cardiopatía pulmonar crónica), cardiopatía cifoscoliótica, miocarditis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibroelastosis endocárdica, bloqueo auriculoventricular, disritmias cardíacas, degeneración miocárdica, enfermedades del sistema circulatorio incluyendo enfermedad cerebrovascular, oclusión y estenosis de las arterias precerebrales, 55 oclusión de las arterias cerebrales, enfermedades de las arterias, arteriolas y capilares (ateroesclerosis, aneurisma), o enfermedad de las venas y los vasos linfáticos.

En una realización, el tratamiento comprende el tratamiento de un paciente con cardiomiopatía con una composición de células terapéuticas que comprende la población de células aislada que comprende las células adherentes 60 derivadas del amnios, tanto con, como sin otro tipo de células. En otras realizaciones preferidas, el paciente experimenta beneficios de la terapia, por ejemplo, de la capacidad de las células de soportar el crecimiento de otras células, incluyendo las células madre o las células precursoras presentes en el corazón, procedentes del crecimiento interno o vascularización del tejido, y de la presencia de factores celulares beneficiosos, quimioquinas, citoquinas y similares, pero las células no se integran o multiplican en el paciente. En otra realización, el paciente se beneficia del 65 tratamiento terapéutico con las células, pero las células no sobreviven durante un periodo prolongado en el paciente. En una realización, el número de células entra en declive gradualmente, viabilidad o actividad bioquímica, en otras

realizaciones, el declive de las células puede estar precedido por un periodo de actividad, por ejemplo, el crecimiento, la división, o la actividad bioquímica. En otras realizaciones, las células senescentes, no viables o incluso muestras son capaces de tener un efecto terapéutico beneficioso.

5 La mejora en un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, en la que se administra al individuo las células adherentes derivadas del amnios o las composiciones terapéuticas proporcionadas en el presente documento, pueden evaluarse o demostrarse mediante la mejora detectable en uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno del sistema circulatorio.

10 En otra realización, la mejora en un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio, en la que se administra al individuo las células adherentes derivadas del amnios o las composiciones terapéuticas proporcionadas en el presente documento, pueden evaluarse o demostrarse mediante la mejora detectable en uno o más indicios de la función cardíaca, por ejemplo, la demostración de una mejora detectable en uno o más del gasto cardíaco en el pecho (CO), índice cardíaco (CI), presiones de enclavamiento de la arteria pulmonar (PAWP), y el índice cardíaco (CI), % de acortamiento fraccionado (% de FS), fracción de eyección (EF), fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF); diámetro diastólico del extremo ventricular izquierdo (LVEDD), diámetro sistólico del extremo ventricular izquierdo (LVESD), contractilidad (por ejemplo, dP/dt), bucles de presión-volumen, medición del trabajo cardíaco, una aumento en el funcionamiento auricular o ventricular; un aumento en la eficacia del bombeo, una disminución en la tasa de pérdida de la eficacia del bombeo, una disminución en la pérdida del funcionamiento hemodinámico; y una disminución en las complicaciones asociadas con la cardiomiopatía, en comparación con el individuo antes de la administración de las células adherentes derivadas del amnios.

La mejora en un individuo que recibe las composiciones terapéuticas proporcionadas en el presente documento pueden evaluarse también mediante métricas subjetivas, por ejemplo, la autoevaluación del individuo acerca de su estado de salud tras la administración.

25 El éxito de administración de las células no está, en determinadas realizaciones, basado en la supervivencia en el individuo de las células adherentes derivadas del amnios administradas. El éxito está, en cambio, basado en una o más métricas de mejora en la salud cardíaca o circulatoria, tal como se ha indicado anteriormente. Por tanto, las células no necesitan integrarse y laten con el corazón del paciente o en los vasos sanguíneos.

30 En determinadas realizaciones, la población aislada de células de la invención para su uso en los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento comprende inducir las células adherentes derivadas del amnios para diferenciarlas a lo largo del linaje mesenquimal, por ejemplo, hacia un genotipo cardiomiogénico, angiogénico o vasculogénico, o en células tales como miocitos, cardiomiocitos, células endoteliales, células miocárdicas, células epicárdicas, células endoteliales vasculares, células del músculo liso (por ejemplo, células del músculo liso vasculares).

40 La administración de células adherentes derivadas del amnios, o las composiciones terapéuticas que comprenden dichas células, a un individuo que lo necesita, puede realizarse, por ejemplo, mediante trasplante, implante (por ejemplo, de las propias células o las células como parte de una combinación de matriz-célula), inyección (por ejemplo, directamente en el sitio de la enfermedad o dolencia, por ejemplo, directamente en un sitio isquémico en el corazón de un individuo que ha tenido un infarto e miocardio), infusión, administración mediante catéter, o cualquier otro medio conocido en la materia para proporcionar la terapia celular.

45 En una realización, se proporcionan composiciones de células terapéuticas a un individuo que lo necesita, por ejemplo, mediante inyección en uno o más sitios en el individuo. En una realización específica, se proporcionan composiciones de células terapéuticas mediante inyección intracardíaca, por ejemplo, a un área isquémica en el corazón. En otras realizaciones específicas, las células se inyectan sobre la superficie del corazón, en un área adyacente, o incluso en un área más remota. En realizaciones preferidas, las células pueden albergar el área enferma o lesionada.

50 Se pueden administrar a un individuo que tiene una enfermedad o dolencia de los sistemas coronario o vascular células adherentes derivadas del amnios en cualquier momento en el que las células serían beneficiosas. En determinadas realizaciones, por ejemplo, la población de células o las composiciones terapéuticas de la invención se administran a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, o 24 horas, o a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 días del infarto de miocardio. La administración próxima en el tiempo a un infarto de miocardio, por ejemplo, a los 1-3 o 1-7 días, es preferible a la administración distal en el tiempo, por ejemplo, tras 3 o 7 días después de un infarto de miocardio. En otras realizaciones, la población de células o las composiciones terapéuticas de la invención se administran a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, o 24 horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 días del diagnóstico inicial de la enfermedad de la enfermedad o dolencia.

65 Se divulgan también en el presente documento kits para su uso en el tratamiento del infarto de miocardio. Los kits proporcionan la composición de células terapéuticas que se puede preparar de una forma farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, mezclándola con un transportador farmacéuticamente aceptable, y un aplicador, junto con las

instrucciones de uso. Idealmente, el kit puede usarse en el campo, por ejemplo, en una consulta médica, o en una atención sanitaria de emergencia que se va a aplicar a un paciente al que se ha diagnosticado que ha tenido un infarto de miocardio o un episodio cardíaco similar.

5 En realizaciones específicas de la población aislada de células de la invención para su uso en los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento, las células adherentes derivadas del amnios se administran con células madre (es decir, las células madre que no son células adherentes derivadas del amnios), mioblastos, miocitos, cardiomioblastos, cardiomiocitos, o precursores de mioblastos, miocitos, cardiomioblastos, y/o cardiomiocitos.

10 En una realización específica, la población aislada de células de la invención para su uso en los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento comprende administrar células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo, una composición terapéutica que comprende las células, a un paciente con una enfermedad del corazón o del sistema circulatorio; y evaluar al paciente para las mejoras en la función cardíaca, en la que la composición de células terapéuticas se administra como un complejo de matriz-célula. En determinadas realizaciones, la matriz es una estructura principal, preferentemente bioabsorbible, que comprende al menos las células.

20 Con este fin, se proporcionan en el presente documento poblaciones de células adherentes derivadas del amnios incubadas en presencia de uno o más factores que estimulan la diferenciación de la célula madre o la célula precursora a lo largo de una ruta cardiogénica, angiogénica, hemangiogénica, o vasculogénica. Dichos factores son conocidos en la técnica; la determinación de las condiciones adecuadas para la diferenciación puede llevarse a cabo con experimentación rutinaria. Dichos factores incluyen, aunque no se limitan a factores, tales como factores de crecimiento, quimioquinas, citocinas, productos celulares, agentes desmetilantes, y otros estímulos que son ahora conocidos o se determinan posteriormente para estimular la diferenciación, por ejemplo, de las células madre, a lo largo de las rutas o linajes cardiogénicos, angiogénicos, hemangiogénico, o vasculogénico.

30 Las células adherentes derivadas del amnios pueden diferenciarse a lo largo de rutas o linajes angiogénicos, hemangiogénicos, o vasculogénicos mediante el cultivo de las células en presencia de factores que comprenden al menos uno de un agente de desmetilación, un BMP, FGF, proteína del factor Wnt, Hedgehog, y/o factores anti-Wnt.

35 La inclusión de agentes de desmetilación tiende a permitir que se diferencien las células a lo largo de las líneas mesenquimales, hacia una ruta cardiomiogénica. Se puede determinar la diferenciación mediante, por ejemplo, la expresión de al menos una de cardiomiosina, miosina esquelética, o GATA4; o mediante la adquisición de un ritmo de latido, espontáneo o inducido de otra manera; o mediante la capacidad de integrarse al menos parcialmente en el músculo cardíaco de un paciente sin inducir arritmias. Los agentes de desmetilación que se pueden usar para iniciar dicha diferenciación incluyen, aunque no de forma limitativa, 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, dimetilsulfóxido, cloruro de queleritrina, ácido retinoico o la sales del mismo, ácido 2-amino-4-(etiltilio)butírico, procainamida, y procaína.

40 En determinadas realizaciones en el presente documento, las células inducidas con uno o más factores como los identificados anteriormente pueden llegar a ser células cardiomiogénicas, angiogénicas, hemangiogénicas, o vasculogénicas, o precursoras. Preferentemente, al menos alguna de las células puede integrarse al menos parcialmente en el sistema cardiovascular de un receptor, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el músculo cardíaco, vascular y otras estructuras del corazón, cardíacas o los vasos sanguíneos periféricos, y similares. En determinadas realizaciones diferentes, las células adherentes derivadas del amnios diferenciadas se diferencian en células que adquieren dos o más de los indicios de células cardiomiogénicas o sus precursores, y son capaces de integrarse parcial o completamente en el corazón o la vasculatura de un receptor. En realizaciones específicas, las células, que se administran a un individuo, dan como resultado una falta de aumento en las arritmias, defectos cardíacos, defectos en los vasos sanguíneos u otras anomalías del sistema circulatorio del individuo o la salud. En determinadas realizaciones, las células adherentes derivadas del amnios actúan para promover la diferenciación de las células madre presentes de forma natural en el músculo cardíaco del paciente, vasos sanguíneos, la sangre y los similares a los mismos se diferencian en, por ejemplo, cardiomiocitos, o al menos, a lo largo de las líneas cardiomiogénicas, angiogénicas, hemangiogénicas, o vasculogénicas.

55 Las células adherentes derivadas del amnios, y las poblaciones de dichas células, pueden proporcionarse terapéutica o profilácticamente a un individuo, por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o dolencia, o que afecta, al corazón o al sistema circulatorio. Dichas enfermedades, trastornos o dolencias pueden incluir insuficiencia cardíaca congestiva debida a aterosclerosis, cardiomiopatía, o lesión cardíaca, por ejemplo, una lesión isquémica, tal como procedente de un infarto de miocardio o herida (aguda o crónica).

60 En determinadas realizaciones, se administra al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células adherentes derivadas del amnios, por ejemplo, en una población de células que comprende las células adherentes derivadas del amnios. En una realización específica, la población comprende aproximadamente un 50 % de células adherentes derivadas del amnios. En otra realización específica, la población es una población prácticamente homogénea de células adherentes derivadas del amnios. En otras realizaciones, la población comprende al menos aproximadamente un 60 %, 66 %, 70 %, 75 %, 80 %, o 90 % de células adherentes derivadas del amnios.

65

Las células adherentes derivadas del amnios pueden administrarse a un individuo en la forma de una composición terapéutica que comprende las células y otro agente terapéutico, tales como el factor de crecimiento de análogo a insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), IL-8, un agente antitrombogénico (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, y PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona); compuestos de antitrombina, antagonistas del receptor de plaquetas, y anticuerpos dirigidos contra trombina, anticuerpos del receptor antiplaquetario, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de la prostaglandina, y/o inhibidores plaquetarios), un agente antiapoptótico (por ejemplo, EPO, derivados y análogos de EPO, y sus sales, TPO, IGF-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o inhibidores de las caspas), un agente antiinflamatorio (por ejemplo inhibidores de la quinasa P38 MAP, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, Pemirolast, Tranilast, Remicade, Sirolimus, compuestos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, Tepoxalina, Tolmetina, o Suprofen), un agente inmunosupresor o inmunomodulador (por ejemplo, inhibidores de calcineurina, por ejemplo, ciclosporina, Tacrolimus, inhibidores de mTOR tales como Sirolimus o Everolimus; antiproliferativos tales como azatioprina y micofenolato de mofetilo; corticoesteroides, por ejemplo, prednisolona o hidrocortisona; anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de IL-2R α , Basiliximab, Daclizuma, anticuerpos policlonales dirigidos contra linfocitos T tales como globulina dirigida contra timocitos (ATG), globulina dirigida contra linfocitos (ALG), y el anticuerpo monoclonal dirigido contra linfocitos T OKT3 o células madre placentarias adherentes tales como se describen en la patente de Estados Unidos n.º 7.468.276, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0275362), y/o un antioxidante (por ejemplo, probucol; vitaminas A, C, y E, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína, o un derivado de antioxidante, análogos o sales de los anteriores). En determinadas realizaciones, las composiciones terapéuticas que comprenden las células adherentes derivadas del amnios comprenden además uno o más tipos de células adicionales, por ejemplo, células adultas (por ejemplo, fibroblastos o células endodérmicas), o células madre o células precursoras. Dichos agentes terapéuticos y/o una o más células adicionales, pueden administrarse a un individuo que lo necesita individualmente o en combinaciones o dos o más de dichos compuestos o agentes.

En determinadas realizaciones, el individuo que se va a tratar es un mamífero. En una realización específica, el individuo que se va a tratar es un ser humano. En realizaciones específicas, el individuo es un animal de ganadería o un animal doméstico. En otras realizaciones específicas, el individuo que se va a tratar es un caballo, oveja, cerdo, perro o gato.

5.10.2 Ictus y otras enfermedades isquémicas

En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento un método para tratar un individuo que tiene una alteración del flujo sanguíneo, por ejemplo, en o alrededor del cerebro, o en la vasculatura periférica, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de las AMDAC. En determinadas realizaciones específicas, la isquemia es una enfermedad arterial periférica (PAD), por ejemplo, es isquemia de la extremidad crítica (CLI). En determinadas realizaciones diferentes, la isquemia es una isquemia del sistema nervioso central (SNC). En determinadas realizaciones diferentes, la isquemia es una enfermedad arterial periférica, una vasculopatía periférica, insuficiencia cardíaca isquémica, una enfermedad isquémica del cerebro, o una enfermedad renal isquémica.

En una realización específica, dicha alteración del flujo de sangre es un ictus. En una realización más específica, dicho ictus es un ictus isquémico. En otra realización más específica, dicho ictus es un ictus hemorrágico, por ejemplo, una hemorragia cerebral intracraneal o una hemorragia subaracnoidea espontánea. En otra realización específica, dicha alteración es un hematoma. En realizaciones más específicas, el hematoma es un hematoma dural, un hematoma subdural o un hematoma subaracnoidea. En otra realización específica, dicho hematoma está producido por una fuerza externa sobre el cráneo, por ejemplo, una lesión en la cabeza. En otra realización específica, dicha alteración es un ataque isquémico transitorio (TIA), por ejemplo, por ejemplo, un TIA recurrente. En otra realización específica, dicha alteración es un vasoespasmio, por ejemplo, un vasoespasmio tras un ictus hemorrágico.

En otra realización específica del método, dicha cantidad terapéuticamente eficaz es un número de AMDAC que da como resultado la eliminación de, una mejora detectable en, la disminución de la gravedad, o el retraso de la progresión de uno o más síntomas, o déficits neurológicos atribuibles a, una alteración del flujo de la sangre en o alrededor del cerebro o el SNC presentada por dicho individuo, por ejemplo, una lesión anóxica o una lesión hipóxica. En otra realización específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de las AMDAC aisladas se administra a dicho individuo profilácticamente, por ejemplo, para reducir o eliminar el daño neurológico producido por una segunda o posterior alteración del flujo de sangre en, o alrededor del cerebro o el SNC tras la mencionada alteración del flujo de sangre.

En otra realización específica, dicho síntoma o alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro, por ejemplo, ictus, una lesión anóxica o una lesión hipóxica, es una o más de hemiplejía (parálisis de un lado del cuerpo); hemiparesis (debilidad en un lado del cuerpo); debilidad del músculo de la cara; entumecimiento; reducción de las sensaciones; sentido del olfato alterado, sentido del gusto, audición o visión; pérdida del olfato, del gusto, audición o visión; caída de un párpado (ptosis); debilidad detectable de un músculo ocular; disminución del reflejo de náuseas; disminución de la capacidad de tragar; disminución de la reactividad de la pupila a la luz; disminución de las

- sensaciones de la cara; disminución del equilibrio; nistagmo; frecuencia respiratoria alterada; frecuencia cardíaca alterada; debilidad en el músculo esternocleidomastoideo con disminución de la capacidad o incapacidad de volver la cabeza a un lado; debilidad en la lengua; afasia (incapacidad de hablar o comprender el lenguaje); apraxia (movimientos voluntarios alterados); un defecto del campo visual; un déficit de memoria; heminegligencia o negligencia hemiespacial (déficit de atención al espacio en el lado del campo visual opuesto a la lesión); pensamiento desorganizado; confusión; desarrollo de gestos hipersexuales; anosognosia (negación persistente de la existencia de un déficit); dificultad para caminar; coordinación alterada del movimiento; vértigo; desequilibrio; pérdida de consciencia; dolor de cabeza; y/o vómitos.
- 10 En otra realización específica, la población de células aisladas de la invención para su uso en los métodos de tratamiento descritos anteriormente comprende administrar un segundo agente terapéutico a dicho individuo. En una realización más específica, dicho segundo agente terapéutico es un agente neuroprotector. En una realización más específica, dicho segundo agente terapéutico es NXY-059 (un derivado de disulfonilo de fenilbutilnitrona: N-óxido de 4-((*terc*-butilimino)-metil)benceno-1,3-disulfonato disódico, o 4-((óxido de-*terc*-butilo-azaniolideno)metil)benceno-1,3-disulfonato disódico; también conocido como disufentón). En otra realización más específica, el segundo agente terapéutico es un agente trombolítico. En una realización más específica, dicho agente trombolítico es un activador del plasminógeno tisular (tPA). En las realizaciones en las que la alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro es una hemorragia, el segundo agente terapéutico puede ser un fármaco antihipertensivo, por ejemplo, un beta bloqueante o fármaco diurético, una combinación de un fármaco diurético y un fármaco diurético ahorrador de potasio, una combinación de un beta bloqueante y un fármaco diurético, una combinación de un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) y un diurético, un antagonista de la angiotensina II y un fármaco diurético, y/o un bloqueante del canal de calcio y un inhibidor de ACE. En otra realización más específica, el segundo agente terapéutico es un bloqueante del canal de calcio, un antagonista del glutamato, un agonista del ácido gamma aminobutírico (GABA), un antioxidante o un sequestrante de radicales libres.
- 25 En otra realización específica de la población aislada de células de la invención para su uso en un método de tratamiento, dichas AMDAC aisladas se administran a dicho individuo en los 21-30, por ejemplo, 21 días del desarrollo de uno o más síntomas de una alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro de dicho individuo, por ejemplo, en los 21-30, por ejemplo, 21 días del desarrollo de los síntomas del ictus, una lesión anóxica o una lesión hipóxica.
- 30 En otra realización específica de la población aislada de células de la invención para su uso en un método de tratamiento, dichas AMDAC aisladas se administran a dicho individuo en los 14 días del desarrollo de uno o más de los síntomas de una alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro de dicho individuo. En otra realización específica de la población aislada de células de la invención para su uso en un método de tratamiento, dichas AMDAC aisladas se administran a dicho individuo en los 7 días del desarrollo de uno o más de los síntomas de una alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro de dicho individuo. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran a dicho individuo en las 48 horas del desarrollo de uno o más síntomas de una alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro de dicho individuo. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran a dicho individuo en las 24 horas del desarrollo de uno o más síntomas de una alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro de dicho individuo. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran a dicho individuo en las 12 horas del desarrollo de uno o más síntomas de una alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro de dicho individuo. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran a dicho individuo en las 3 horas del desarrollo de uno o más síntomas de una alteración del flujo de sangre en o alrededor del cerebro de dicho individuo.
- 45 En una realización específica, dicha alteración del flujo de sangre es una isquemia de la extremidad crítica. En otra realización más específica, dicha CLI es un bloqueo grave en las arterias de las extremidades inferiores, que reduce marcadamente el flujo de sangre. En otra realización más específica dicha CLI se caracteriza por un dolor isquémico en reposo, un dolor grave en las piernas y los pies mientras que una persona no está en movimiento, llagas que no cicatrizan en los pies o las piernas, dolor o entumecimiento en los pies, piel seca, brillante, suave de las piernas o los pies, engrosamiento de las uñas de los pies, pulso ausente o disminuido en las piernas o los pies, heridas abiertas, infecciones o úlceras de la piel que no se curan, gangrena seca (piel negra, seca) de las piernas o los pies. En otra realización específica, la CLI puede conducir a la pérdida de dígitos y/o extremidades completas. En otra realización específica del método, dicha cantidad terapéuticamente eficaz es un número de AMDAC que da como resultado la eliminación de, una mejora detectable en, disminuir la gravedad, o retrasar la progresión de uno o más síntomas de, pérdida de la función de la extremidad y/o privación de oxígeno (hipoxia/anoxia) atribuible a, una alteración del flujo de la sangre en o alrededor del cerebro o el SNC presentada por dicho individuo, por ejemplo, una lesión anóxica o una lesión hipóxica. En otra realización específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de las AMDAC aisladas se administra a dicho individuo profilácticamente, por ejemplo, para reducir o eliminar el daño al tejido producido por una segunda o posterior alteración del flujo de sangre en o alrededor de la extremidad tras dicha alteración del flujo de sangre.

5.10.3 Dosificaciones y rutas de administración

- 65 La administración de las AMDAC a un individuo que lo necesita puede ser mediante cualquier ruta médicamente relevante para la enfermedad o dolencia que se va a tratar. En otra realización específica de la población aislada de células de la invención para su uso en los métodos de tratamiento descritos anteriormente, dichas AMDAC se

administran mediante inyección en bolo. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran mediante infusión intravenosa. En una realización específica, dicha infusión intravenosa es una infusión intravenosa durante aproximadamente 1 a aproximadamente 8 horas. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran intracranalmente. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran intramuscularmente. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran intraperitonealmente. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran intraarterialmente. En una realización más específica, dichas AMDAC aisladas se administran en un área de isquemia. En otra realización más específica, dichas AMDAC aisladas se administran en un área periférica de una isquemia. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran por vía intramuscular, intradérmica, o subcutánea.

En otra realización específica de la población aislada de células de la invención para su uso en los métodos de tratamiento descritos anteriormente, dichas AMDAC se administran una vez a dicho individuo. En otra realización específica, dichas AMDAC aisladas se administran a dicho individuo en dos o más administraciones separadas. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^4 y 1×10^5 AMDAC aisladas, por ejemplo, AMDAC por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^5 y 1×10^6 AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^6 y 1×10^7 AMDAC aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^7 y 1×10^8 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otras realizaciones específicas, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 2×10^6 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 2×10^6 y aproximadamente 3×10^6 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 3×10^6 y aproximadamente 4×10^6 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 4×10^6 y aproximadamente 5×10^6 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 5×10^6 y aproximadamente 6×10^6 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 6×10^6 y aproximadamente 7×10^6 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 7×10^6 y aproximadamente 8×10^6 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo; entre aproximadamente 8×10^6 y aproximadamente 9×10^6 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo; o entre aproximadamente 9×10^6 y aproximadamente 1×10^7 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 2×10^7 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo a dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente $1,3 \times 10^7$ y aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo a dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar hasta aproximadamente 3×10^7 células placentarias aisladas por kilogramo de dicho individuo a dicho individuo. En una realización específica, dicha administración comprende administrar entre aproximadamente 5×10^6 y aproximadamente 2×10^7 células placentarias aisladas a dicho individuo. En otra realización específica, dicha administración comprende administrar 150×10^6 células placentarias aisladas en aproximadamente 20 mililitros de solución a dicho individuo.

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

5.11 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIO

Las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento pueden diferenciarse. En una realización, la célula se ha diferenciado suficientemente para que dicha célula presente al menos una característica de una célula endotelial, una célula miogénica, o una célula pericítica, por ejemplo, poniendo en contacto la célula con un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o como se describe en las Secciones 5.11.2, 6.3.3, o 6.3.4, a continuación. En realizaciones más específicas, dicha característica de una célula endotelial, célula miogénica o célula pericítica es la expresión de una o más de CD9, CD31, CD54, CD102, NG2 (antígeno 2 neural/glial) o actina alfa del músculo liso, que está aumentada en comparación con una célula amniótica que es OCT-4⁻, VEGFR2/KDR⁺, CD9⁺, CD54⁺, CD105⁺, CD200⁺, y VE-caderina⁻. En otras realizaciones más específicas, dicha característica de una célula endotelial, célula miogénica o célula pericítica es la expresión de una o más de CD9, CD31, CD54, CD102, NG2 (antígeno 2 neural/glial) o actina alfa del músculo liso, que está aumentada en comparación con una célula amniótica que es OCT-4⁻, VEGFR2/KDR⁺, y VEGFR1/Flt-1⁺.

5.11.1 Inducción de la angiogénesis

La angiogénesis de las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento puede llevarse a cabo del siguiente modo. Las células adherentes derivadas del amnios, se cultivan, por ejemplo, en un medio de células endoteliales, por ejemplo, EGM®-2 (Lonza) o un medio que comprende 60 % de DMEM-LG (Gibco), 40 % de MCDB-201 (Sigma); 2 % de suero de feto de ternera (Hyclone Labs); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linolénico-albúmina de suero de bovino (LA-BSA); 5 x 10⁻⁹ M de dexametasona (Sigma); 10⁻⁴M de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (R&D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (R&D Systems), para el paso 3. A continuación, las células se siembran en placas sobre MATRIGEL™ o un sustrato que comprende colágeno-1, por ejemplo, en placas de 96 pocillos a una densidad de, por ejemplo, aproximadamente 1,5 x 10⁴ células por pocillo en el mismo medio o DMEM con FBS (0 - 5 % v/v) que comprende factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a, por ejemplo, aproximadamente 10 a 50 ng por mililitros. Se puede cambiar el medio aproximadamente dos veces a la semana. La angiogénesis se evidencia mediante la inspección visual de las células para el brote de estructuras vasculares y la formación del tubo, visible con microscopio a un aumento de, por ejemplo, 50X a 100X.

5.11.2 Inducción de la diferenciación en células cardíacas

Se puede llevar a cabo la diferenciación de las células adherentes derivadas del amnios proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, colocando las células en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en los cardiomiocitos. Un medio cardiomiocítico preferido comprende DMEM/20 % de CBS suplementado con ácido retinoico, 1 µM; factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/ml; y factor beta-1 de crecimiento transformante, 2 ng/ml; y factor de crecimiento epidérmico, 100 ng/ml. se puede usar KnockOut Serum Replacement (Invitrogen, Carlsbad, California) en lugar de CBS. Como alternativa, las células adherentes derivadas del amnios se cultivan en DMEM/20 % CBS suplementado con 1 a 100, por ejemplo, 50 ng/ml de cardiotropina-1 durante 24 horas. En otra realización, las células adherentes derivadas del amnios pueden cultivarse 10-14 días en medio exento de proteínas durante 5-7 días, estimulado a continuación con extracto de miocardio humano, por ejemplo, producido homogeneizando el miocardio humano en tampón HEPES al 1 % suplementado con un 1 % de suero de la sangre del cordón.

La diferenciación puede confirmarse mediante demostración de la expresión génica de la actina cardíaca, por ejemplo, mediante RT/PCR, o mediante latido visible de la célula. Se considera que una célula adherente se ha diferenciado en una célula cardíaca cuando la célula presenta una o más de estas características.

6. Ejemplos

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

Este ejemplo demuestra el aislamiento y la expansión de las células adherentes derivadas del amnios.

6.1.1 Aislamiento

Las células adherentes derivadas del amnios se aislaron de la membrana amniótica del siguiente modo. El amnios/corion se cortaron de la placenta, y al amnios se separó manualmente del corion. El amnios se enjuagó con PBS estéril para eliminar la sangre residual, los coágulos de la sangre y otros materiales. se usó una gasa estéril para eliminar la sangre adicional, los coágulos de la sangre u otros materiales que no se eliminaron enjuagando, y el amnios se enjuagó de nuevo con PBS. El PBS en exceso se retiró de la membrana, y se cortó el amnios con un escalpelo en segmentos de 2" x 2" (5,08 cm x 5,08 cm). Para la liberación de las células, se ajustó un recipiente de procesamiento conectando un recipiente de procesamiento con un vidrio con camisa estéril a un baño de agua en circulación a 37 °C usando tubería y conectores, y ajustado sobre una placa con agitación. Se calentó tripsina (0,25 %, 300 ml) a 37 °C en el recipiente de procesamiento; se añadieron los segmentos del amnios, y se agitó la suspensión de amnios/tripsina, por ejemplo, a 100 RPM-150 RPM a 37 °C durante 15 minutos. Se ensambló un sistema de cribado estéril colocando un receptáculo estéril sobre un campo estéril a continuación del vaso de procesamiento e insertando un tamiz estéril de 75 µm a 125 µm en el receptáculo (Millipore, Billerica, MA). Tras agitar los segmentos del amnios durante 15 minutos, los contenidos del recipiente de procesamiento se transfirieron al tamiz, y los segmentos del amnios se transfirieron, por ejemplo, usando pinzas estériles de nuevo en el recipiente de procesamiento; se descartó la solución de tripsina que contenía las células epiteliales. Los segmentos del amnios se agitaron de nuevo con 300 ml de solución de tripsina (0,25 %) como se ha descrito anteriormente. se enjuagó el tamiz con aproximadamente 100-150 ml de PBS, y se descartó la solución de PBS. Tras agitar los segmentos del amnios durante 15 minutos, los contenidos del recipiente de procesamiento se transfirieron al tamiz. A continuación, los segmentos del amnios se transfirieron de nuevo al recipiente de procesamiento; se descartó la solución de tripsina que contenía las células epiteliales. Los segmentos del amnios se agitaron de nuevo con 300 ml de solución de tripsina (0,25 %) como se ha descrito anteriormente. se enjuagó el tamiz con aproximadamente 100-150 ml de PBS, y se descartó la solución de PBS. Tras agitar los segmentos del amnios durante 15 minutos, los contenidos del recipiente de procesamiento se transfirieron al tamiz. A continuación, los segmentos del amnios se transfirieron de nuevo en el recipiente de procesamiento, y se descartó la solución de tripsina que contenía las células epiteliales. Los segmentos del amnios se agitaron en PBS/5 % FBS (relación 1:1 del amnios a PBS/5 % de solución de FBS por volumen) a 37 °C durante aproximadamente 2-5 para neutralizar la tripsina. Se ensambló un sistema de filtración estéril nuevo. Tras neutralizar la tripsina, los contenidos

del recipiente de procesamiento se transfirieron al nuevo tamiz, y los segmentos del amnios se transfirieron de nuevo al recipiente de procesamiento. Temperatura ambiente, se añadió PBS estéril (400 ml) al recipiente de procesamiento, y los contenidos del recipiente de procesamiento se agitaron durante aproximadamente 2-5 minutos. El tamiz se enjuagó con aproximadamente 100-150 ml de PBS. Tras la agitación, los contenidos del recipiente de procesamiento se transfirieron al tamiz; el matraz de procesamiento se enjuagó con PBS, y se descartó la solución de PBS. A continuación, el recipiente de procesamiento se rellenó con 300 ml de DMEM precalentado, y los segmentos del amnios se transfirieron a la solución de DMEM.

Para la liberación de las células adherentes derivadas del amnios, la membrana amniótica tratada se trató adicionalmente con colagenasa del siguiente modo. Se preparó una solución madre de colagenasa estéril (500 U/ml) disolviendo la cantidad adecuada de polvo de colagenasa (que varía con la actividad del lote de colagenasa recibido del suministrador) en DMEM. La solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se dispensó en recipientes estériles individuales. Se añadió solución de CaCl₂ (0,5 ml, 600 mM) a cada dosis de 100 ml, y se congelaron las dosis. Se añadió colagenasa (100 ml) a los segmentos del amnios en el recipiente de procesamiento, y el recipiente de procesamiento se agitó durante 30-50 minutos, o hasta que se completó la digestión del amnios mediante inspección visual. Después que se completó la digestión del amnios, se añadieron 100 ml de PBS/5 % de FBS estéril precalentado al recipiente de procesamiento, y el recipiente de procesamiento se agitó durante 2-3 minutos más. Tras la agitación, los contenidos del matraz se transfirieron a un tamiz de 60 µm estéril, y el líquido se recogió mediante filtración al vacío. El recipiente de procesamiento se enjuagó con 400 ml de PBS, y la solución de PBS se filtró estéril. A continuación, la suspensión de células filtrada se centrifugó a 300 x g durante 15 minutos a 20 °C, y los aglomerados celulares se resuspendieron en PBS/2 % de FBS precalentado (aproximadamente un total de 10 ml).

6.1.2 Establecimiento

Se añadieron células amnióticas angiogénicas aisladas al medio de crecimiento que contenía 60 % de DMEM-LG (Gibco); 40 % de MCB2-201 (Sigma); FBS al 2 % (Hyclone Labs), 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 10 ng/ml de ácido linoléico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); 1 de n-dexametasona (Sigma); ácido ascórbico 2-fosfato 100 µM (Sigma); 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (R & D Systems); y 10 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (R & D Systems) y se sembraron en placas en un matraz en T a una densidad de siembra de 10.000 células por cm². A continuación, los dispositivos de cultivo se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % con > 90 % de humedad. La unión celular, el crecimiento, y la morfología se controlaron diariamente. Las células no adherentes y los desechos se eliminaron mediante el intercambio del medio. El intercambio del medio se llevó a cabo dos veces por semana. Las células adherentes con una morfología con forma fibroblastoide/de husillo típica aparecieron varios días después tras la siembra en placas inicial. Cuando la confluencia alcanzó 40 % - 70 % (a los 4 - 11 tras la siembra en placas inicial), las células se recogieron mediante tripsinización (tripsina al 0,25 % - EDTA) durante 5 minutos a temperatura ambiente (37 °C). Tras la neutralización con PBS-5 % de FBS, se centrifugaron las células a 200 - 400 g durante 5-15 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se resuspendieron en medio de crecimiento. En este punto, se consideró que se había establecido satisfactoriamente una línea AMDAC en el paso inicial. Las células adherentes derivadas del amnios del paso inicial, en algunos casos, se crioconservaron o expandieron.

6.1.3 Procedimiento de cultivo

Se cultivaron células adherentes derivadas del amnios en el medio de crecimiento descrito anteriormente y se sembraron a una densidad de 2000 - 4000 por cm² en dispositivos de cultivo tratados con cultivo de tejidos adecuado. A continuación, los dispositivos de cultivo se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % con > 90 % de humedad. Durante el cultivo, las células se adherirían y proliferarían. El crecimiento celular, la morfología, y la confluencia se controlaron diariamente. Se llevó a cabo el intercambio del medio dos veces a la semana para reponer los nutrientes recientes si el cultivo se extendió a 5 días o más. Cuando la confluencia alcanzó un 40 % - 70 % (a los 3 - 7 días después de la siembra), las células se recogieron mediante tripsinización (0,05 % - 0,25 % de tripsina - EDTA) durante 5 minutos a temperatura ambiente (37 °C). Tras la neutralización con PBS-5 % de FBS, se centrifugaron las células a 200 - 400 g durante 5-15 minutos a temperatura ambiente, a continuación se resuspendieron en medio de crecimiento.

Las AMDAC aisladas y cultivadas de esta manera produjeron normalmente 33530 +/-15090 unidades formadoras de colonias (fibroblastos) (UFC-F) de 1 x 10⁶ células sembradas en placa.

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

6.2.1 Perfiles de expresión de genes y proteínas

Este Ejemplo describe la caracterización fenotípica de células adherentes derivadas del amnios, incluidos marcadores característicos de la superficie celular, ARNm, y expresión proteómica.

Preparación de muestras: Las células adherentes derivadas del amnios se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 1. Las células en el paso 6 se hicieron crecer hasta aproximadamente un 70 % de confluencia en medio de cultivo como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente, se tripsinizaron y se lavaron con PBS. Células NTERA-2 (American Type Culture Collection, número ATCC CRL-1973) se hicieron crecer en DMEM que contenía 4,5 g/l de glucosa,

glutamina 2 mM y FBS al 10 %. Se realizaron recuentos de células nucleadas para obtener un mínimo de 2×10^6 a 1×10^7 células. A continuación, las células se lisaron usando un kit Qiagen RNeasy (Qiagen, Valencia, CA), utilizando un QIAshredder, para obtener los lisados. A continuación se realizó el aislamiento del ARN usando un kit Qiagen RNeasy. La cantidad y calidad de ARN se determinaron usando un espectrofotómetro Nanodrop ND1000, 25 ng/μl de ARN/reacción. Las reacciones de ADNc se prepararon usando el kit de Applied Biosystems (Foster City, CA) High Capacity cDNA Archive. Las reacciones de la PCR en tiempo real se realizaron usando mezclas maestras universales para PCR TAQMAN® de Applied Biosystems. Las reacciones se realizaron en el modo convencional del sistema Applied Biosystems 7300 Real time PCR durante 40 ciclos.

- 5
- 10 *Análisis de la muestra y resultados:* Usando la metodología de la PCR en tiempo real y sondas de expresión génica TAQMAN® específicas y/o la matriz de angiogénesis humana TAQMAN® (Applied Biosystems), las células se caracterizaron según la expresión de marcadores angiogénicos y cardiomiogénicos relacionados con células madre. Los resultados se expresaron bien como la expresión relativa de un gen de interés en comparación con los controles de células pertinentes, o la expresión relativa (delta Ct) del gen de interés en comparación con un gen constitutivo expresado ubicuamente (por ejemplo, GAPDH, 18S, o GUSB).
- 15

Las células adherentes derivadas del amnios expresaron diversos genes angiogénicos y cardiomiogénicos relacionados con células madre, y mostraron una ausencia relativa de la expresión de OCT-4 en comparación con las células NTERA-2. La Tabla 1 resume la expresión de genes angiogénicos, cardiomiogénicos y de células madre seleccionadas.

20

Tabla 1: Perfil de expresión génica de células adherentes derivadas del amnios tal como se determina mediante la RT-PCR.

Marcador AMDAC	Positivo	Negativo	ARNm
ACTA2	X		X
ACTC1	X		X
ADAMTS1	X		X
AMOT	X		X
ANG	X		X
ANGPT1	X		X
ANGPT2	X		X
ANGPT4		X	X
ANGPTL1	X		X
ANGPTL2	X		X
ANGPTL3		X	X
ANGPTL4	X		X
BAI1	X		X
BGLAP		X	X
c-myc	X		X
CD31		X	X
CD34		X	X
CD44	X		X
CD140a	X		X
CD140b	X		X
CD200	X		X

25

ES 2 749 500 T3

(continuación)

Marcador AMDAC	Positivo	Negativo	ARNm
CD202b	X		X
CD304	X		X
CD309 (VEGFR2/KDR)	X		X
CDH5		X	X
CEACAM1	X		X
CHGA	X		X
COL15A1	X		X
COL18A1	X		X
COL4A1	X		X
COL4A2	X		X
COL4A3	X		X
Conexina-43	X		X
CSF3	X		X
CTGF	X		X
CXCL10		X	X
CXCL12	X		X
CXCL2	X		X
DLX5		X	X
DNMT3B	X		X
ECGF1	X		X
EDG1	X		X
EDIL3	X		X
ENPP2	X		X
EPHB2	X		X
F2	X		X
FBLN5	X		X
FGA		X	X
FGF1	X		X
FGF2	X		X
FGF4		X	X
FIGF	X		X
FLT3		X	X
FLT4	X		X
FN1	X		X
FOXC2	X		X
Folostatina	X		X

ES 2 749 500 T3

(continuación)

Marcador AMDAC	Positivo	Negativo	ARNm
Galectina-1	X		X
GRN	X		X
HEY1	X		X
HGF	X		X
HLA-G		X	X
HSPG2	X		X
IFNB1	X		X
IFNG		X	X
IL-8	X		X
IL-12A	X		X
ITGA4	X		X
ITGAV	X		X
ITGB3	X		X
KLF-4	X		X
LECT1		X	X
LEP		X	X
MDK	X		X
MMP-13		X	X
MMP-2	X		X
MYOZ2	X		X
NANOG		X	X
NESTIN		X	X
NRP2	X		X
PDGFB	X		X
PF4	X		X
PGK1	X		X
PLG		X	X
POU5F1 (OCT-4)		X	X
PRL		X	X
PROK1		X	X
PROX1	X		X
PTN	X		X
SEMA3F	X		X
SERPINB5	X		X
SERPINC1	X		X
SERPINF1	X		X

(continuación)

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

La columna "ARNm" indica que la presencia o ausencia de ARNm de marcadores concretos que se determinaron en cada caso.

5 En un experimento independiente, se descubrió además que las AMDAC expresaban genes del translocador nuclear 2 de aril hidrocarburos (ARNT2), factor de crecimiento de nervios (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), neurotrofina 3 (NT-3), NT-5, Factor 1 α inducible por hipoxia (HIF1A), proteína 2 inducible por hipoxia (HIG2), hemo oxigenasa (desciclación) 1 (HMOX1), Superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn] (SOD3), catalasa (CAT), factor β 1 de crecimiento transformante (TGFB1), receptor del factor β 1 de crecimiento transformante (TGFB1R), y receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGFR/c-met).

10 **6.2.2 Citometría de flujo para la evaluación de la potencia angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios**

Se usó la citometría de flujo como método para cuantificar los marcadores fenotípicos de las células adherentes derivadas del amnios y definir la identidad de las células. Las muestras de células se obtuvieron de muestras madre congeladas. Antes de la descongelación y durante la preparación de los reactivos, los viales de células se colocaron sobre hielo seco. Posteriormente, las muestras se descongelaron rápida,ente usando un baño de agua a 37 °C. Los recuentos de células antes de la congelación se usaron en cálculos de las diluciones iniciales dependientes del número de células posterior a la descongelación. En resumen, los crioviales se descongelaron en un baño de agua a 37 °C durante aproximadamente 30 segundos con agitación suave. Inmediatamente después de la descongelación, aproximadamente 100-200 μ l de solución de descongelación fría (2 a 8 °C) (PBS con albúmina al 2,5 % y Gentrán 40 al 5 %) se añadieron al criovial y se mezclaron. Tras suave agitación, el volumen total de los crioviales se transfirió a un tubo cónico de 15 ml que contenía un volumen igual de solución de descongelación fría (2 a 8 °C). Las células se centrifugaron en un tubo cónico a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de retirar el sobrenadante. El volumen residual se midió con una pipeta (estimación); el volumen residual y el aglomerado celular se resuspendieron a temperatura ambiente en FBS al 1 % en PBS para conseguir una concentración celular de 250 x 10³ células/100 μ l de tampón. Por ejemplo, 1 x 10⁶ células se resuspenderían en 400 μ l de FBS al 1 %. La suspensión celular se introdujo en tubos para FACS de 5 ml premarcados (Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ). Para cada isotipo de anticuerpo primario, 100 μ l de suspensión de células se distribuyó en alícuotas en un tubo control de isotipo.

Antes del análisis del fenotipo, se optimizaron las concentraciones de todos los anticuerpos para conseguir buenas relaciones de señal a ruido y una detección adecuada de los antígenos CD a través de un intervalo dinámico potencial de 4 unidades logarítmicas. Se determinó el volumen de cada anticuerpo de isotipo y muestra que se utilizó para teñir cada muestra. Para normalizar la cantidad de anticuerpo (en µg) en los tubos de isotipo y muestra, la concentración de cada anticuerpo se calculó como $(1/\text{concentración de anticuerpo real } (\mu\text{g}/\mu\text{l})) \times (\text{cantidad deseada del anticuerpo final en } \mu\text{g para } 2,5 \times 10^5 \text{ células}) = \text{n.º } \mu\text{l de anticuerpo añadido}$. Se preparó una mezcla maestra de anticuerpos tanto para el isotipo como para la muestra con la cantidad adecuada de anticuerpo añadida a cada tubo. Las células se tiñeron durante 15-20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de la coloración, el anticuerpo no unido en cada muestra se eliminó por centrifugación (400 g x 5 minutos) seguido por lavado usando 2 ml de PBS con FBS al 1 % (temperatura ambiente) antes de la resuspensión en 150 µl de PBS con FBS al 1 % a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se analizaron en citómetros de flujo Becton Dickinson FACSCalibur, FACSCantol o BD FACSCantolII preparados para su uso según las instrucciones del fabricante. Los conjuntos de datos multiparamétricos de citometría de flujo (dispersión lateral (SSC), dispersión hacia delante (FSC) y perfiles de fluorescencia integrados (FL)) se adquirieron sin establecer parámetros de compensación del instrumento sobre la marcha. Los parámetros de compensación se determinaron después de la adquisición con el programa informático FACSDiva de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estas configuraciones del instrumento se aplicaron a cada muestra. Los conjugados de fluoróforo utilizados en estos estudios fueron aloficocianina (APC), AlexaFluor 647 (AF647), isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), y proteína clorofílica peridina (PerCP), todos de BD Biosciences. La Tabla 2 resume la expresión de marcadores de superficie celular seleccionados, incluidos marcadores angiogénicos.

Tabla 2: Expresión de marcadores de la superficie celular en células adherentes derivadas del amnios tal como se determina mediante citometría de flujo.

Marcador AMDAC	Positivo	Negativo	Citometría de flujo con inmunolocalización
CD6		X	X
CD9	X		X
CD10	X		X
CD31		X	X
CD34		X	X
CD44	X		X
CD45		X	X
CD49b	X		X
CD49c	X		X
CD49d	X		X
CD54	X		X
CD68	X		X
CD90	X		X
CD98	X		X
CD105	X		X
CD117		X	X
CD133		X	X
CD143		X	X
CD144 (VE-caderina)		X	X
CD146		X	X
CD166	X		X
CD184		X	X

(continuación)

Marcador AMDAC	Positivo	Negativo	Citometría de flujo con inmunolocalización
CD200	X		X
CD202b	X		X
CD271		X	X
CD304	X		X
CD309 (VEGFR2/KDR)	X		X
CD318	X		X
CD349	X		X
CytoK	X		X
HLA-ABC+ B2 Micro+	X		X
Cadena invariante+ HLA-DR-DP-DQ+		X	X
PDL-1	X		X
VEGFR1/FLT-1	X		X
			X

La columna "Citometría de flujo con inmunolocalización" indica que la presencia o ausencia de determinados marcadores se determinó mediante inmunolocalización, específicamente citometría de flujo.

5 En otro experimento, las células se marcaron con un anticuerpo dirigido contra CD49f humano (clon GoH3, conjugado con ficoeritrina; BD Pharmingen n.º de pieza 555736), y se analizaron mediante citometría de flujo. Aproximadamente un 96 % de las AMDAC quedaron marcadas con el anticuerpo dirigido contra CD49f (esto es, eran CD49f*).

10 En otros experimentos, las AMDAC se investigaron adicionalmente mediante inmunolocalización según si expresaban CD49a, CD106, CD119, CD130, c-met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; HGFR), receptor 1 de la citoquina CXC (CXCR1), PDGFRA, y PDGFRB mediante inmunolocalización. También se descubrió que las AMDAC, mediante inmunolocalización, carecen de la expresión de CD49e, CD62E, receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), miembro 12A de la superfamilia del factor de necrosis tumoral ("TNFRSF12A"), receptor 1 del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1R), CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR6, receptor 1 de quimioquina (CCR1), CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), receptor de insulina (CD220), receptor 4 de interleuquina (IL4-R; CD124), IL6-R (CD126), TNF-R1a y 1b (CD120a, b), y erbB2/Her2.

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

20 Las células adherentes derivadas del amnios procedentes del paso 6 se hicieron crecer hasta aproximadamente un 70 % de confluencia en portas con cámaras de 4 pocillos y se fijaron con una solución de formalina al 4 % 30 minutos cada uno. Después de la fijación, los portas se enjuagaron dos veces con PBS durante 5 minutos. A continuación, los portas se incubaron con suero normal al 10 % procedente del mismo hospedador como anticuerpo secundario, 2x caseína, y 0,3 % de Triton X100 en PBS, durante 20 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. El exceso de suero se vertió y los portas se incubaron con el anticuerpo primario (IgG policlonal de cabra (Santa Cruz; Santa Cruz, CA) en una cámara húmeda. El tiempo y la temperatura de las incubaciones se determinaron seleccionando las condiciones óptimas para el anticuerpo que estaba siendo utilizado. En general, los tiempos de incubación fueron de 1 a 2 horas a 37 °C o durante la noche a 4 °C. A continuación, los portas se enjuagaron tres veces con PBS durante 5 minutos cada vez y se incubaron durante 20-30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda con anticuerpo secundario contra inmunoglobulina conjugado con una molécula fluorescente dirigido contra el hospedador del anticuerpo primario (anticuerpo de conejo contra inmunoglobulina de cabra (Santa Cruz)). Posteriormente, los portas se enjuagaron tres veces con PBS durante 5 minutos cada vez, se montaron con un cubre usando solución de montaje DAPI VECTASHIELD® (Vector Labs) para contratación de los núcleos. La tinción de las células se observó con un microscopio de fluorescencia Nikon. Todas las imágenes se tomaron con un tiempo de exposición análogo normalizado contra el fondo del isotipo correspondiente (IgG de cabra (Santa Cruz)). La Tabla 3 resume los resultados de la expresión de proteínas angiogénicas en células adherentes derivadas del amnios.

Tabla 3: Marcadores angiogénicos presentes o ausentes en células adherentes derivadas del amnios.

Marcador AMDAC	Positivo	Negativo	Inmunolocalización <i>Inmunohistoquímica de inmunofluorescencia</i>
CD31		X	X
CD34		X	X
(VEGFR2/KDR)	X		X
Conexina-43	X		X
Galectina-1	X		X
TEM-7	X		X

Las células adherentes derivadas del amnios expresaron el marcador angiogénico marcador 7 de tumor endotelial (TEM-7), una de las proteínas mostradas en la Tabla 3. Véase la Fig. 2.

5

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

Purificación de proteínas de la membrana: Las células en el paso 6 se hicieron crecer hasta aproximadamente un 70 % de confluencia en medio de cultivo, se tripsinizaron y se lavaron con PBS. Después, las células se incubaron durante 15 minutos con una solución que contenía cóctel de inhibidor de proteasa (P8340, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) antes de la lisis celular. A continuación, las células se lisaron por adición de una solución de HCl 10 mM (evitando así el uso de detergentes) y se centrifugaron durante 10 minutos a 400 g para aglomerar y retirar los núcleos. El sobrenadante postnuclear se transfirió a un tubo de ultracentrifugación y se centrifugó con una ultracentrífuga WX80 provista de un rotor T-1270 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC) a 100.000 g durante 150 minutos, generando un aglomerado de proteínas de membrana.

Generación, inmovilización y digestión de proteoliposomas: El aglomerado de proteínas de membrana se lavó varias veces con tampón Nanoxis Tris 10 mM, NaCl 300 mM, pH 8). El aglomerado de proteínas de membrana se suspendió en 1,5 ml de tampón Nanoxis y después se sonicó con una punta usando un procesador ultrasónico VIBRA-CELL™ VC505 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT) durante 20 minutos sobre hielo. El tamaño de los proteoliposomas se determinó mediante tinción con el colorante FM1-43 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y visualización con microscopio de fluorescencia. La concentración de proteínas en la suspensión de proteoliposomas se determinó mediante un ensayo BCA (Thermo Scientific). Los proteoliposomas se inyectaron en una celda de LPI™ Flow Cell (Nanoxis AB, Gothenburg, Suecia) usando una punta de pipeta normalizada y se dejaron inmovilizar durante 1 hora. Tras la inmovilización, se realizaron una serie de etapas de lavado y tripsina a 5 µg/ml (Princeton Separations, Adelphi, NJ) se inyectó directamente a la celda LPI™ Flow Cell. La oblea se incubó durante la noche a 37 °C y los péptidos tripticos se eluyeron de la oblea LPI™ y después se desalaron con un cartucho Sep-Pak (Waters Corporation, Milford, MA).

Análisis CL/EM/EM con trampa de iones lineal LTQ: Cada muestra con digestión triptica se separó en una columna MAGIC C18 de 0,2 mm x 150 mm 3 µm de 200 Å (Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA) que estaba conectada directamente con una fuente de ionización mediante electropulverización nanocapilar asistida con desolvatación axial asistida por vacío (ADVANCE) (Michrom Bioresources, Inc.) usando un gradiente de 180 minutos (Tampón A: Agua, Ácido fórmico al 0,1 %; Tampón B: Acetonitrilo, Ácido fórmico al 0,1 %). La fuente ADVANCE consigue una sensibilidad que es comparable al nanoESI tradicional pero funciona con un caudal considerablemente más alto de 3 µl/min. Los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas provisto de trampa de iones lineal LTQ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) que utilizó diez barridos EM/EM dependientes de los datos seguido cada uno de ellos por un espectro de masas con barrido completo. Se recogieron siete conjuntos de datos de las réplicas analíticas para cada muestra biológica.

Bioinformática: Siete archivos de datos en bruto correspondientes a los 7 conjuntos de datos de las réplicas analíticas que se recogieron para cada una de las líneas de células se investigaron en una búsqueda única en la base de datos IPI Human Database usando una implementación del algoritmo SEQUEST en una estación de trabajo Sorcerer Solo™ (Sage-N Research, San Jose, CA). Se especificó una tolerancia de masa de péptido de 1,2 uma, se especificó la oxidación de la metionina como modificación diferencial, y se especificó la carbamidometilación como modificación estática. La implementación del programa informático Scaffold del Trans-Proteomic Pipeline (TPP) se utilizó para clasificar y analizar los datos proteómicos de la membrana. Las proteínas se tuvieron en cuenta para el análisis si se identificaron con una probabilidad de péptido del 95 %, probabilidad de proteína del 95 % y 1 péptido único. Las comparaciones entre los conjuntos de datos de proteómica de membrana se realizaron con un programa en Perl de desarrollo propio.

50

Resultados: Como se muestra en la Tabla 4, las células adherentes derivadas del amnios expresaron varios

marcadores angiogénicos y cardiomiogénicos.

Tabla 4: Marcadores cardiomiogénicos o angiogénicos expresados en células adherentes derivadas del amnios.

Marcador AMDAC	Positivo	Negativo	Inmunolocalización <i>Proteómica de membrana</i>
Receptor de tipo IIB de la activina	X		X
ADAM 17	X		X
Alfa-actinina 1	X		X
Angiotensinógeno	X		X
Filamina A	X		X
Receptor I y II del LDL acetilado de macrófagos	X		X
Megalina	X		X
Cadena pesada de la miosina no muscular de tipo A	X		X
Proteína C de unión a miosina de tipo cardíaco	X		X
Wnt-9	X		X

5 **6.2.5 Perfilado del secretoma para la evaluación de la potencia angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios**

10 *Matrices de proteínas:* Las células adherentes derivadas del amnios en el paso 6 se sembraron en número de células iguales en medio de cultivo y se el medio condicionado se recogió después de 4 días. Se realizó un análisis cualitativo simultáneo de múltiples citoquinas/factores de crecimiento angiogénicos en el medio condicionado de células usando matrices de proteínas RayBiotech Angiogenesis Protein Arrays (Norcross, GA). En resumen, las matrices de proteínas se incubaron con 2 ml de 1X Tampón de bloqueo (Ray Biotech) a temperatura ambiente durante 30 minutos (min) para bloquear las membranas. Posteriormente, el Tampón de bloqueo se decantó y las membranas se incubaron con 1 ml de muestra (medio de crecimiento condicionado por las respectivas células durante 4 días) a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas. A continuación, las muestras se decantaron y las membranas se lavaron 3 x 5 min con 2 ml de 1X Tampón de bloqueo I (Ray Biotech) a temperatura ambiente con agitación. Después, las membranas se lavaron 2 x 5 min con 2 ml de 1X Tampón de bloqueo II (Ray Biotech) a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, se añadió 1 ml de anticuerpos conjugados con biotina (Ray Biotech) diluidos a cada membrana y se incubaron a temperatura ambiente durante 1-2 horas y se lavaron con los tampones de lavado como se ha descrito anteriormente. 15 20 A continuación se añadió estreptavidina conjugada con HRP (2 ml) a cada membrana y las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, las membranas se volvieron a lavar, se incubaron con el kit de detección ECL™ (Amersham) de acuerdo con las especificaciones y los resultados se visualizan y se analizaron con el sistema Kodak Gel Logic 2200 Imaging System. La secreción de varias proteínas angiogénicas por AMDAC se muestra en la Fig. 3.

25 *ELISA:* El análisis cuantitativo de citoquinas/factores de crecimiento angiogénicos en medio condicionado por células se llevó a cabo usando kits comercialmente disponibles de R&D Systems (Mineápolis, MN). En resumen, se realizaron ensayos ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la cantidad de los respectivos factores de crecimiento angiogénicos en el medio condicionado se normalizaron a 1×10^6 células. Las células adherentes derivadas del amnios (n = 6) presentaron aproximadamente 4500 pg VEGF por millón de células y aproximadamente 17.200 pg de IL-8 por millón de células. 30

Tabla 5: Resultados ELISA para marcadores angiogénicos

Marcador AMDAC	Positivo	Negativo	Análisis del secretoma por <i>ELISA, Matrices de proteínas</i>
ANG	X		X
EGF	X		X
ENA-78	X		X

(continuación)

Marcador AMDAC	Positivo	Negativo	Análisis del secretoma por ELISA, Matrices de proteínas
FGF2	X		X
Folistatina	X		X
G-CSF	X		X
GRO	X		X
HGF	X		X
IL-6	X		X
IL-8	X		X
Leptina	X		X
MCP-1	X		X
MCP-3	X		X
PDGFB	X		X
PLGF	X		X
Rantes	X		X
TGFB1	X		X
Trombopoyetina	X		X
TIMP1	X		X
TIMP2	X		X
uPAR	X		X
VEGF	X		X
VEGFD	X		X

En un experimento independiente, se confirmó que las AMDAC también secretan angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, PECAM-1 (CD31; molécula de adhesión a células endoteliales plaquetarias), laminina y fibronectina.

5

6.2.6 La expresión de microARN en AMDAC confirma la actividad angiogénica

Este Ejemplo demuestra que las AMDAC expresan niveles más altos de algunos microARN (miARN), y niveles más bajos de algunos otros miARN, cada uno de los cuales se corresponden con una función angiogénica, de las células madre mesenquimales derivados de la médula ósea.

10

Se sabe que la miR-296 proangiogénica regula la función angiogénica mediante la regulación de los niveles de receptores de factores de crecimiento. Por ejemplo, miR-296 en células endoteliales contribuye significativamente a la angiogénesis dirigiéndose directamente al ARNm del sustrato tirosina quinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGS), lo que produce una disminución en los niveles de HGS y reduciendo de esta forma la degradación mediada por HGS de los receptores de los factores de crecimiento VEGFR2 y PDGFRb. Véase Würdinger et al., Cancer Cell 14:382-393 (2008). Además, se ha comprobado que miR-15b y miR-16 controlan la expresión de VEGF, un factor proangiogénico clave implicado en la angiogénesis, y que la reducción inducida por hipoxia del miR-15b y miR-16 contribuye a un aumento de VEGF, una citoquina proangiogénica. Véase Kuelbacher et al., Trends in Pharmacological Sciences, 29(1):12-15 (2007).

15

20

Las AMDAC se prepararon como se describe en el Ejemplo 1, anterior. Las AMDAC y las células BM-MSC (utilizadas como comparador) se sometieron a preparación de microARN (miARN) usando un kit de aislamiento de miARN MIRVANA™ (Ambion, n.º Cat. 1560). $0,5 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^6$ células se perturbaron en un tampón de lisis desnaturalizante. A continuación, las muestras se sometieron a extracción con fenol ácido + cloroformo para aislar el ARN fuertemente enriquecido con especies de ARN pequeño. Se añadió un 100 % de etanol para llevar las muestras a un 25 % de etanol. Cuando esta mezcla de lisado/etanol se hizo pasar por un filtro de fibra de vidrio, los ARN grandes quedaron inmovilizados, y las especies de ARN pequeño se recogieron en el filtrado. La concentración de etanol en el filtrado se aumentó a continuación hasta el 55 %, y la mezcla se hizo pasar a través de un segundo filtro de fibra de vidrio donde los ARN pequeños quedaron inmovilizados. Este ARN se lavó, y se eluyó en una solución de fuerza iónica

25

30

baja. La concentración y pureza del ARN pequeño recuperado se determinaron por medición de su absorbancia a 260 y 280 nm.

Se descubrió que las AMDAC expresaban los siguientes miARN angiogénicos: miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92, miR-20a, miR-20b, (miembros del clúster de miARN angiogénico 17-92), miR-296, miR-221, miR-222, miR-15b, miR-16. También se descubrió que las AMDAC expresaban niveles más altos de los siguientes miARN angiogénicos en comparación con las células madre mesenquimales derivados de médula ósea (BM-MSC): miR-17-3p, miR-18a, miR-18b, miR-19b, miR-92 (miembros del clúster de miARN angiogénico 17-92), miR-296. Estos resultados se correlacionan bien con la observación de que las AMDAC expresan niveles altos de EGFR2/KDR (véase más arriba). Por el contrario, se ha descubierto que las AMDAC expresan niveles más bajos de los siguientes miARN angiogénicos en comparación con las (BM-MSC): miR-20a, miR-20b, (miembros del clúster de miARN angiogénico 17-92), miR-221, miR-222, miR-15b, miR-16. La expresión reducida de miR-15b y miR-16 se correlaciona con los niveles de expresión más altos de VEGF observados en las AMDAC.

6.3 EJEMPLO 3: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIO

Este Ejemplo demuestra diferentes características de las AMDAC asociadas con la angiogénesis y la capacidad de diferenciación.

6.3.1 Formación de tubos en HUVEC para la evaluación de la potencia angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios

Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se subcultivaron en el paso 3 o menos en medio EGM-2 (Cambrex, East Rutherford, NJ) durante 3 días, y se recogieron en la confluencia a aproximadamente un 70 %-80 %. Las HUVEC se lavaron una vez con medio basal/antibióticos (DMEM/F12 (Gibco)) y se resuspendieron en el mismo medio a la concentración deseada. Las HUVEC se utilizaron en un plazo de 1 hora a partir de su preparación. Colágeno placentario humano (HPC) se llevó a una concentración de 1,5 mg/ml en HCl 10 mM (pH 2,25), se "neutralizó" con tampón hasta pH 7,2 y se mantuvo sobre hielo hasta su uso. La HPC se combinó con la suspensión de HUVEC a una concentración final de células de 4000 células/μl. La suspensión HUVEC/HPC resultante se pipeteó inmediatamente en placas de 96 pocillos a 3 μl por pocillo (el perímetro de la placa debe prerrellenarse con PBS estéril para evitar la evaporación, n = 5 por condición). Las gotículas de HUVEC se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 75-90 minutos sin adición de medio para permitir la polimerización del colágeno. Tras completarse la incubación en "seco", cada pocillo se llenó suavemente con 200 μl de medio AMDAC condicionado (n = 5 líneas de células) o medio de control (por ejemplo, DMEM/F12 como control negativo, y EGM-2 como el control positivo) y se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 20 horas. El medio condicionado se preparó incubando células adherentes derivadas del amnios en el paso 6 en medio de cultivo durante 4 - 6 horas; tras unión y dispersión, el medio se cambió a DMEM/F12 durante 24 horas. Después de la incubación, el medio se retiró de los pocillos sin perturbar las gotículas de HUVEC y los pocillos se lavaron una vez con PBS. A continuación, las gotículas de HUVEC se fijaron durante 10 segundos y se tñieron durante 1 minuto con un kit de tinción celular Diff-Quik y posteriormente se enjuagaron 3 x veces con agua estéril. Las gotículas tñidas se dejaron secar al aire y se tomaron imágenes de cada pocillo usando el microscopio Zeiss SteReo Discovery V8. A continuación, las imágenes se analizaron usando el paquete de programas informáticos, "ImageJ" y/o MatLab. Las imágenes se convirtieron de imágenes en color a una escala de grises de 8 bytes y se aplicaron los umbrales para convertirla en una imagen en blanco y negro. A continuación, la imagen se analizó usando características de análisis de partículas, que proporcionó los datos de intensidad de los píxeles, incluido el re (número de partículas individuales), área total, tamaño promedio (de partículas individuales) y fracción de área, que equivale a la cantidad de formación de tubos endoteliales en el ensayo.

El medio condicionado ejerció un efecto angiogénico sobre las células endoteliales, como se demuestra mediante la inducción de la proliferación de formación de tubos (véase la Fig. 4).

6.3.2 Ensayo de migración de HUVEC

Este experimento demostró la capacidad angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios. Las HUVEC se hicieron crecer hasta confluencia en una placa de 12 pocillos vestidos con fibronectina (FN) y la monocapa se "hirió" con una punta de pipeta de plástico de 1 ml para crear una línea acelular a través del pocillo. La migración de las HUVEC se sometió a ensayo incubación las células "heridas" con medio condicionado exento de suero (EBM2; Cambrex) obtenido de 5 líneas celulares adherentes derivadas del amnios después de 3 días de crecimiento. El medio EBM2 sin células se usó como el control. Tras 15 horas, la migración de las células hacia el área acelular se registró (n = 3) usando un microscopio invertido. A continuación, las fotografías se analizaron usando el paquete de programas informáticos, "ImageJ" y/o MatLab. Las imágenes se convirtieron de imágenes en color a una escala de grises de 8 bytes y se aplicaron los umbrales para convertirla en una imagen en blanco y negro. A continuación, la imagen se analizó usando características de análisis de partículas, que proporcionó los datos de intensidad de los píxeles, incluido el re (número de partículas individuales), área total, tamaño promedio (de partículas individuales) y fracción de área, que equivale a la cantidad de migración de las células endoteliales en el ensayo. El grado de migración celular se puntuó contra el tamaño de la línea herida inicialmente registrada, y los resultados se normalizaron a 1x10⁶ células.

Los factores tróficos secretados por las células adherentes derivadas del amnios ejercieron efectos angiogénicos sobre las células endoteliales, como se demuestra mediante la inducción de migración celular (Fig. 5).

En un experimento independiente, las HUVEC se hicieron crecer hasta subconfluencia en una placa de 96 pocillos revestida de FN, y la inducción de la proliferación se sometió a ensayo incubando las células con medio condicionado exento de suero procedente de cada una de las 5 líneas de células adherentes derivadas del amnios (medio EBM-2, 3 días). El medio EBM-2 se usó como control negativo, y el medio EGM-2 se usó como el control positivo. Tras 48 horas, la proliferación celular se puntuó según las mediciones del contenido en ADN usando un ensayo de proliferación Promega Cell Titer 96® AZ One Solution Cell (Promega, Madison, WI). Las barras de error denotan desviaciones estándar de las réplicas analíticas (n=3) y los resultados se normalizaron a 1×10^6 células.

Los factores tróficos secretados por las células adherentes derivadas del amnios dieron como resultado un aumento en la concentración de ADN, que es indicativo de la proliferación de las HUVEC. Véase la Fig. 6, donde "CM" es medio condicionado.

6.3.3 Captación de lipoproteína de baja densidad acetilada (AcLDL) para la evaluación de la potencia angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios

Las células endoteliales y células microgliales en cultivo se pueden identificar por su capacidad para captar AcLDL fluorescente. Si los restos de lisina de una apolipoproteína de LDL están acetilados, el complejo LDL deja de unirse al receptor de LDL y, en su lugar, se puede capturar por las células endoteliales y los macrófagos de una forma muy específica de la célula.

Las células adherentes derivadas del amnios se hicieron crecer en medio de cultivo sin VEGF, o en medio EGM2-MV (Cambrex) con VEGF, para evaluar la potencia angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios de una forma general, así como el efecto de VEGF sobre el potencial de diferenciación de las células adherentes derivadas del amnios. Las células se cultivaron en sus respectivos medios en placas de 12 pocillos durante de 4 a 7 días hasta que alcanzaron un 70-80 % de confluencia y, posteriormente, se incubaron con $10 \mu\text{g/ml}$ de LDL acetilado (Invitrogen) durante la noche. A continuación, se contratiñeron con Calceína AM (Invitrogen) y se evaluaron según su captación de LDL acetilado usando microscopía de fluorescencia. Las HUVEC como células de control para la captación de LDL acetilado se hicieron crecer en medio EGM2-MV y se analizaron como se ha descrito anteriormente. Las células adherentes derivadas del amnios presentaron una captación mínima de LDL acetilado en condiciones de crecimiento normales, pero se indujeron/diferenciaron para aumentar su captación tras estimulación con VEGF. Véase la Fig. 7.

6.3.4 Formación de tubos para la evaluación de la potencia angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios

Las células adherentes derivadas del amnios se hicieron crecer bien en medio de cultivo sin VEGF o en medio EGM2-MV con VEGF para evaluar la potencia angiogénica de las células de una forma general, así como el efecto de VEGF sobre el potencial de diferenciación de las células. Las HUVEC, como células de control para la formación de tubos, se hicieron crecer en EGM2-MV. Las células se cultivaron en sus respectivos medios durante de 4 a 7 días hasta que alcanzaron un 70-80 % de confluencia. Una solución fría ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) de MATRIGEL™ ($50 \mu\text{l}$; BD Biosciences) se dispensó a los pocillos de una placa de 12 pocillos y la placa se incubó durante 60 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ para dejar que la solución gelificara. Las células AMDAC y HUVEC se tripsinizaron, se resuspendieron en el medio adecuado (con y sin VEGF) y se añadieron $100 \mu\text{l}$ de células diluidas (1 a 3×10^4 células) a cada uno de los pocillos que contenían MATRIGEL™. Las células en el MATRIGEL™ polimerizado, en presencia o ausencia de $0,5$ a 100 ng de VEGF, se introdujeron durante de 4 a 24 horas en una incubadora con CO_2 al 5 % a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Tras la incubación, las células se evaluaron para determinar si hay signos de formación de tubos usando un microscopio óptico convencional.

Las células adherentes derivadas del amnios mostraron una formación de tubos mínima en ausencia de VEGF, pero se indujeron/diferenciaron para formar estructuras de tipo tubular tras estimulación con VEGF. Véase la Fig. 8.

6.3.5 Sensibilidad a hipoxia para la evaluación de la potencia angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios

Para evaluar la funcionalidad angiogénica de las células endoteliales y/o precursores endoteliales, las células se evaluaron respecto de su capacidad para secretar factores de crecimiento angiogénicos en condiciones hipóxicas y normóxicas. El cultivo en condiciones hipóxicas suele inducir un aumento en la secreción de factores de crecimiento angiogénicos tanto por las células endoteliales como por células precursoras endoteliales, lo que se puede medir en el medio condicional. Las células adherentes derivadas del amnios se sembraron en placas en números de células equivalentes en su medio de cultivo habitual y se hicieron crecer hasta aproximadamente un 70-80 % de confluencia. Posteriormente, las células se cambiaron a medio exento de suero (EBM-2) y se incubaron en condiciones normóxicas ($21 \text{ } \text{O}_2$) o hipóxicas ($1 \text{ } \text{O}_2$) durante 48 h. Se recogieron los medios condicionados y se analizó la secreción de factores de crecimiento angiogénicos mediante kits ELISA comercialmente disponibles de R&D Systems. Los ensayos ELISA se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la cantidad de los respectivos factores de crecimiento angiogénicos (VEGF e IL-8) en el medio condicionado se normalizaron a 1×10^6 células.

Las células adherentes derivadas del amnios presentaron una secreción elevada de varios factores de crecimiento angiogénicos en condiciones hipóxicas. Véase la Fig. 9.

- 5 En un experimento independiente, Las AMDAC se sembraron en placas en números de células equivalentes en medio de cultivo habitual y se hicieron crecer hasta aproximadamente un 70-80 % de confluencia. Posteriormente, las células se cambiaron a medio exento de suero (EBM-2) y se incubaron en condiciones normóxicas (21 % O₂) o hipóxicas (1 % O₂) durante 48 h. Las células se sometieron a análisis mediante citometría de flujo para determinar el marcador celular CD202b (también conocido como Tie2, Tek, o receptor de la angiopoyetina-1), un receptor implicado en el desarrollo vascular y la angiogénesis. Se recogieron los medios condicionados y se analizó la secreción de factores de crecimiento angiogénicos mediante kits ELISA comercialmente disponibles (R&D Systems). Los análisis mediante citometría de flujo se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente, y los ensayos ELISA se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de los respectivos factores de crecimiento angiogénicos en el medio condicionado se normalizaron a 1×10^6 células. Las AMDAC presentaron una expresión elevada de CD202b en condiciones hipóxicas, en comparación con las condiciones normóxicas. Véase la Fig. 10.

6.3.6 Diferenciación cardiomiogénica para la evaluación de la potencia angiogénica de las células adherentes derivadas del amnios

- 20 Para inducir la diferenciación de las células precursoras hacia un linaje cardiomiocítico, se realizó en varias etapas una combinación de cultivo en gota colgante (HD [por sus siglas en inglés] para detener la proliferación de las células e iniciar el proceso de diferenciación) con posterior tratamiento de las células en crecimiento detenido con factores de crecimiento específicos. Después del cultivo en gota colgante, las células se indujeron con combinaciones de activina A, proteína morfogenética ósea 4 (BMP4), factor de crecimiento de fibroblastos básico, (bFGF, también conocido como FGF2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, también conocido como VEGFA) y el homólogo 1 de dickkopf (DKK1) durante un período de 16 días. En resumen, las células adherentes derivadas del amnios se hicieron crecer hasta aproximadamente un 70 % de confluencia en medio de cultivo normalizado. A continuación, las células se tripsinizaron y se lavaron en tampón como se ha descrito anteriormente. Gotas de 20 μ l que contenían 700 células se suspendieron en el medio pertinente y se colocaron sobre la cara interna de la tapa de una placa Petri de 100 ml usando una pipeta multicanal. La tapa se invirtió cuidadosamente y se colocó sobre la parte superior de la placa, que contenía 25 ml de PBS estéril para evitar que las gotas se sequen. Los cultivos en gota colgante se incubaron durante 48 h a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %. Posteriormente, los cuerpos agregados de las células se volvieron a sembrar en placas de cultivo revestidas con gelatina al 0,1 % que contenía medio de diferenciación específico del linaje para inducción posterior.

- 35 Las etapas de estimulación se realizaron de la siguiente forma: Etapa 1, 4 días BMP4 (0,5 ng/ml); Etapa 2, 5 días BMP4 (10 ng/ml), bFGF (5 ng/ml), Activina A (3 ng/ml); Etapa 3, 3 días VEGF (10 ng/ml), DKK1 (150 ng/ml); Etapa 4, 4 días VEGF (10 ng/ml), DKK1 (150 ng/ml), bFGF (5 g/ml) (+/- 5-10 nM 5-aza-citidina). Posteriormente, se preparó el ARN total de las células tratadas, y se realizaron análisis qRT-PCR para determinar los marcadores cardiomiogénicos como se ha descrito anteriormente.

Los resultados mostraron que las células adherentes derivadas del amnios se pueden inducir/diferenciar para expresar diversos marcadores cardiomiocíticos. Véase la Fig. 11.

6.3.7 Respuesta de HUVEC a medio condicionado con AMDAC

- Las AMDAC se cultivaron durante 48 horas en medio de cultivo que contenía 60 % de DMEM-LG (Gibco); 40 % de MCB2-201 (Sigma); FBS al 2 % (Hyclone Labs), 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 10 ng/ml de ácido linolénico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); 1 de n-dexametasona (Sigma); ácido ascórbico 2-fosfato 100 μ M (Sigma); 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (R & D Systems); y 10 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (R & D Systems), y después se cultivaron durante 48 h más en medio exento de suero. El medio condicionado del cultivo de AMDAC se recogió y se utilizó para estimular las HUVEC que se habían privado de suero durante 5, 15, y 30 minutos. Las HUVEC posteriormente se lisaron y se tiñeron con un kit BD™ CBA (ensayo citométrico con perlas) Cell Signaling Flex (BD Biosciences) para determinar las fosfoproteínas conocidas por tener una función en la ruta de señalización angiogénica. Se descubrió que las AMDAC eran fuertes activadores de AKT-1 (que inhibe procesos apoptóticos), AKT-2 (que es una importante proteína de señalización en la ruta de señalización de la insulina, y rutas de proliferación celular ERK 1/2 en las HUVEC. Estos resultados demuestran adicionalmente la capacidad angiogénica de las AMDAC.

6.4 EJEMPLO 4: INDUCCIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS POR LAS AMDAC

Este ejemplo demuestra que las AMDAC promueven la angiogénesis en un ensayo *in vivo* usando membrana corioalantoidea de pollo (CAM).

- 65 Se llevaron a cabo dos ensayos separados de la CAM. En el primer ensayo de la CAM, se evaluaron los aglomerados de células intactas de diferentes preparaciones de las AMDAC. En el segundo ensayo de la CAM, se evaluaron los

sobrenadantes de diferentes preparaciones de AMDAC. Se usó el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) como un control positivo y las células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano como una referencia (control negativo). El criterio de valoración del estudio era determinar las densidades de los vasos sanguíneos de todos los grupos de tratamiento y grupos control.

5

6.4.1 Células que utilizan el ensayo de CAM

Se usaron tres preparaciones de células AMDAC, denominadas en el presente documento Lote 1, Lote 2 y Lote 3, preparadas como se ha descrito y criopreservadas. Las AMDAC se descongelaron para determinar la dosificación y se determinó el número de células dosificadas en la CAM.

10

Diseño del estudio: El estudio incluyó 7 grupos con 10 embriones en cada grupo. EL diseño del estudio se describe en la Tabla 6.

15

Tabla 6: Grupos de estudio, ensayo de angiogénesis en membrana corioalantoidea de pollo.

N.º de grupo	N.º de embriones	Tratamiento	Criterio de valoración
1	10	Control del vehículo (mezcla de 40 µl de PBS/ MATRIGEL™, 1:1 en volumen)	Puntuación de densidad del vaso sanguíneo
2	10	Control positivo, tratado con bFGF (una mezcla de 100 ng/CAM en 40 µl de DMEM/ MATRIGEL™, 1:1)	Igual que en el grupo 1
3	10	Control del medio (40 µl de DMEM)	Igual que en el grupo 1
4	10	AMDACS, Lote 1	Igual que en el grupo 1
5	10	AMDACS, Lote 2	Igual que en el grupo 1
6	10	AMDACS, Lote 3	Igual que en el grupo 1
7	10	Células MDA-MB-231 P34, Lote n.º 092608	Igual que en el grupo 1

20

25

30

Procedimiento de ensayo de CAM: Se incubaron huevos fértiles frescos durante 3 días en una estufa incubadora de huevos convencional a 37 °C durante 3 días. El día 3, los huevos se cascaron en condiciones estériles y los embriones se colocaron en veinte placas de plástico de 100 mm y se cultivaron a 37 °C en una estufa incubadora de embriones con un depósito de agua en la estantería inferior. Se burbujeó aire continuamente en el depósito de agua usando una bomba pequeña con el fin de que la humedad en la estufa incubadora se mantuviera constante. El día 6, una junta tórica de silicona estéril se colocó en cada CAM y a continuación se administraron las AMDAC a una densidad de $7,69 \times 10^5$ células/40 µl de una mezcla de medio/MATRIGEL™ (1:1) en cada junta tórica en una capucha estéril. Las tablas 2A y 2B representan el número de células usadas y la cantidad de medio añadida a cada preparación de células para la dosificación. Los embriones del control del vehículo recibieron 40 µl del vehículo (PBS/ MATRIGEL™, 1:1), los controles positivos recibieron 100 ng/ml de bFGF en 40 µl de una mezcla de medio DMEM/ MATRIGEL™ (1:1), y los controles del medio recibieron 40 µl de medio DMEM. Los embriones se devolvieron a la estufa incubadora después que se completó cada dosificación. En el día 8, los embriones se retiraron de la estufa incubadora y se mantuvieron a temperatura ambiente mientras se determinaba la densidad del vaso sanguíneo en cada junta tórica utilizando un sistema de captura de imágenes a un aumento de 100 X.

35

Se midió la densidad del vaso sanguíneo mediante un sistema de puntuación de la angiogénesis que utilizaba los números aritméticos 0 a 5 o los números exponenciales 1 a 32, para indicar el número de vasos sanguíneos presentes en los sitios de tratamiento en la CAM. Los números con mayor puntuación representaron una densidad mayor del vaso mientras que 0 representó ausencia de angiogénesis. Se calculó el porcentaje de inhibición en cada sitio de dosificación usando la puntuación registrada para este sitio dividida por la puntuación media obtenida de las muestras del control para cada experimento individual. Se calculó el porcentaje de inhibición para cada dosis de un compuesto dado combinando todos los resultados obtenidos para esta dosis de 8-10 embriones.

Tabla 7: Cantidad de medio añadida a cada preparación de células para la normalización de la suspensión final de células para la dosificación

Línea de células	Tamaño del aglomerado	Normalización con DMEM y MATRIGEL™	Volumen final de la suspensión de células
AMDAC Lote 1	260 µl	0 µl + 260 µl MATRIGEL™	520 µl
AMDAC Lote 2	170 µl	90 µl + 260 µl MATRIGEL™	520 µl
AMDAC Lote 3	170 µl	90 µl + 260 µl MATRIGEL™	520 µl
MDA-MB-231	40 µl	220 µl + 260 µl MATRIGEL™	520 µl

Todas las células se utilizaron en el paso 6.

5 Resultados

Los resultados de las puntuaciones de densidades de vasos sanguíneos se muestran en la Fig. 12. Los resultados indican claramente que las puntuaciones de densidad de los vasos sanguíneos de las membranas corioalantoideas de pollo tratadas con cada una de las suspensiones de células madre, o 100 ng/ml de bFGF o suspensiones de células MDAMB231 de cáncer de pollo fueron estadísticamente significativa mayores en comparación con aquellas de las CAM del control del vehículo ($P < 0.001$, test de la "t" de Student). El medio utilizado para cultivar las células madre no tiene ningún efecto sobre la densidad del vaso sanguíneo. Asimismo, la inducción de la densidad de los vasos sanguíneos de las preparaciones de AMDAC mostró alguna variación, pero las variaciones no fueron estadísticamente significativas. Esto concluye que la potencia de inducción de cada una de las 5 preparaciones de células madre fue aproximadamente la misma.

6.4.2 Sobrenadantes de células AMDAC que utilizan el ensayo de CAM

Las muestras de sobrenadante procedentes de células MDA-MB-231 y de cada una de las diferentes preparaciones de células madre descritas en el ensayo de CAM de las AMDAC anterior se usaron en un segundo ensayo de CAM. Como con cada ensayo de CAM de las AMDAC, bFGF y las células MDA-MB-231 se usaron como controles positivos.

Diseño del estudio: El estudio incluyó 7 grupos con 10 embriones en cada grupo. EL diseño del estudio se describe en la Tabla 8.

Tabla 8: Diseño del estudio - Ensayo de CAM utilizando sobrenadantes celulares

N.º de grupo	N.º de embriones	Tratamiento	Criterio de valoración
1	10	Control del vehículo (mezcla de 40 µl de PBS/ MATRIGEL™, 1:1 en volumen)	Puntuación de densidad del vaso sanguíneo
2	10	Control positivo, tratado con bFGF (una mezcla de 100 ng/CAM en 40 µl de DMEM/ MATRIGEL™, 1:1)	Igual que en el grupo 1
3	10	Control del medio (40 µl de DMEM)	Igual que en el grupo 1
4	10	Sobrenadante de las AMDAC Lote 1	Igual que en el grupo 1
5	10	Sobrenadante de las AMDAC Lote 2	Igual que en el grupo 1
6	10	Sobrenadante de las AMDAC Lote 3	Igual que en el grupo 1
7	10	Sobrenadante de las células MDAMB231 (P34)	Igual que en el grupo 1

Las células AMDAC se usaron en Paso 6.

Procedimiento de ensayo de CAM: El procedimiento de ensayo fue el mismo que se ha descrito anteriormente en el ensayo de CAM de las AMDAC. La única diferencia fue que el sobrenadante de cada preparación de células madre o de las células MDA-MB-231 se usó como material de prueba. Para la dosificación, cada sobrenadante se mezcló con MATRIGEL™ (1:1 en volumen) y 40 µl de la mezcla se dosificaron a cada embrión.

Resultados

Las puntuaciones de densidad de los vasos sanguíneos (véase la FIG. 13) indican que la inducción de la formación de vasos sanguíneos por el sobrenadante de cada preparación de células madre difirió. Las muestras de sobrenadante de los tres lotes de AMDAC mostraron un efecto significativo sobre la inducción de vasos sanguíneos con $P < 0,01$, $P < 0,001$, y $P < 0,02$ (test de la "t" de Student) respectivamente. Como cabía esperar, bFGF del control positivo mostró también una potente inducción de la formación de vasos sanguíneos como se ha observado anteriormente en el ensayo de CAM n.º 1 ($P < 0,001$, test de la "t" de Student). Sin embargo, el sobrenadante de las células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano no muestra una inducción significativa sobre la formación de vasos sanguíneos en comparación con los controles del vehículo. Como se muestra anteriormente, el medio de cultivo solo no tiene ningún efecto.

6.5 EJEMPLO 5: LAS AMDAC MUESTRAN EFECTO NEUROPROTECTOR

Este Ejemplo demuestra que las AMDAC tienen un efecto neuroprotector en condiciones de bajo contenido de oxígeno y de glucosa usando un ensayo de ataque con privación de oxígeno-glucosa (OGD), y reduce las especies reactivas de oxígeno. Por tanto, estos resultados indican que las AMDAC serían útiles para tratar dolencias isquémicas tales como el ictus o la enfermedad vascular periférica, y que protegerían contra las lesiones producidas por la reperfusión en dolencias isquémicas.

Neuronas humanas (ScienCell, n.º de catálogo 1520) se cultivaron según las recomendaciones del fabricante. En resumen, los recipientes de cultivo se revistieron con poli-L-lisina (2 µg/ml) en agua destilada estéril durante 1 hora a 37 °C. El recipiente se lavó tres veces con H₂O doblemente destilada. Se añadió medio de neuronas (ScienCell) a los pocillos que se equilibraron a 37 °C en una incubadora. Las neuronas se descongelaron y se añadieron directamente a los recipientes sin centrifugación. Durante el posterior cultivo, el medio se cambió al día siguiente de iniciar el cultivo, y a partir de ese momento en días alternos. Las neuronas estuvieron normalmente listas para el ataque el día 4.

Se preparó medio OGD (medio Eagle modificado por Dulbecco exento de glucosa) calentando en primer lugar el medio en un baño de agua, en parte para reducir la solubilidad del oxígeno en el medio líquido. Se burbujeó nitrógeno al 100 % durante 30 minutos a través del medio usando una piedra de difusión de 0,5 µm para eliminar el oxígeno disuelto. Se añadió tampón HEPES a una concentración final de 1 µM. El medio se añadió directamente a las neuronas al finalizar la purga. Una pequeña muestra del medio se distribuyó en alícuotas para confirmar los niveles de oxígeno usando un detector de oxígeno en una punta de inmersión. Los niveles de oxígeno se redujeron normalmente del 0,9 % al 5,0 % de oxígeno.

Se preparó una cámara de hipoxia colocando la cámara en una incubadora a 37 °C durante al menos 4 horas (preferentemente durante la noche) antes de la gasificación. Se retiró el medio de los recipientes de cultivo y se sustituyó por medio desgasificado, y los recipientes de cultivo se introdujeron en la cámara de hipoxia. A continuación, la cámara de hipoxia se purgó con una mezcla gaseosa de 95 % N₂/5 % CO₂ a través del sistema a un caudal de 20-25 Lpm durante al menos 5 minutos. El sistema se incubó en la incubadora a 37 °C durante 4 horas, con desgasificación de la cámara una vez más después de 1 hora.

Al finalizar el procedimiento de ataque, el medio OGD se aspiró, y se añadió medio caliente a las neuronas. 24-28 horas después, las AMDAC y las neuronas se sembraron en números iguales a 100.000 células cada uno por pocillo de una placa de 6 pocillos suspendida en medio neuronal que se añadió a las neuronas y se cultivó simultáneamente durante 6 días.

Las fotomicrografías se tomaron de campos aleatorios de una placa de 6 pocillos para cada condición. Se identificaron las células que tenían una morfología de neuronas típica, y se registraron las longitudes de las neuritas. La longitud promedio de las neuritas se correlacionó positivamente con la salud neuronal, y fueron mayores en los cultivos simultáneos de neuronas y AMDAC, lo que indica que las AMDAC estaban protegiendo las células del ataque.

Ensayo de especies reactivas de oxígeno

Se ha determinado que las AMDAC expresan los genes de la superóxido dismutasa, catalasa y hemo oxigenasa durante la hipoxia. La capacidad de las AMDAC para secuestrar las especies reactivas de oxígeno, y para proteger las células de dichas especies, se determinó en un ensayo que utilizaba peróxido de dilaurilo como generador de especies reactivas de oxígeno.

Descripción del ensayo: Las células diana (astrocitos, ScienCell Research Laboratories) se sembraron en placas de 96 pocillos de color negro prerrevestidas con poli-L-lisina a 6000/cm². Se dejó que los astrocitos se adhirieran durante la noche en medio de cultivo a 37 °C con dióxido de carbono, al 5 %. Al día siguiente, el medio de cultivo se retiró y las células se incubaron con tinte permeable a células DCFH-DA (diacetato de diclorofluoresceína), que es una sonda fluorogénica. El exceso de colorante se retiró por lavado con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, o solución salina tamponada de Hank. A continuación, las células se atacaron con especies reactivas de oxígeno por adición de peróxido de hidrógeno 1000 µM durante 30-60 minutos. El medio que contenía peróxido de hidrógeno se retiró a continuación y se sustituyó por medio de cultivo exento de suero y exento de glucosa. Las AMDAC (cualquiera de las células designadas como Lote 1 o Lote 2), o BM-MS-C, se añadieron a 6000/cm², y las células se cultivaron

durante 24 horas más. Después, las células se leyeron en un lector de placas de fluorescencia convencional a 480Ex y 530Em. El contenido de especies reactivas de oxígeno del medio era directamente proporcional a los niveles de DCFH-DA en el citosol celular. El contenido de especies reactivas de oxígeno se midió por comparación con una curva patrón de DCF predeterminada. Todos los experimentos se realizaron con N=24.

5 Para el ensayo, 1X DCFH-DA se preparó inmediatamente antes de su uso por dilución de una solución madre de 20 X DCFH-DA hasta 1X en medio de cultivo celular sin suero de feto de bovino, y con agitación hasta homogeneidad. Las diluciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se prepararon en DMEM o DPBS según necesidad. Se preparó una
10 curva patrón por diluciones en serie 1:10 en el intervalo de concentraciones de 0 µM a 10 µM por dilución de patrón DCF 1 mM en medio de cultivo celular, transferencia de 100 µl de patrón DCF a una placa de 96 pocillos adecuada para medición de fluorescencia, y adición de 100 µl de tampón de lisis celular. La fluorescencia se leyó a 480Ex y 530Em.

15 Resultados: Ambos lotes de AMDAC utilizados redujeron significativamente la concentración de especies reactivas de oxígeno en los cultivos simultáneos de astrocitos. Véanse las Figs. 14A y 14B. Por el contrario, Las BM-MSc no consiguieron reducir significativamente las especies reactivas de oxígeno en los cultivos simultáneos de astrocitos.

6.6 MÉTODOS DE TRATAMIENTO UTILIZANDO CÉLULAS ADHERENTES DERIVADAS DEL AMNIO

20 6.6.1 Tratamiento del infarto de miocardio

Un individuo varón en la mitad de los 50 presenta dolor de pecho que radia al brazo izquierdo durante más de 20 minutos, dificultad para respirar, náuseas, palpitaciones, sudoración. Con los resultados del electrocardiograma y un aumento y una disminución de los niveles en sangre de la cretina quinasa, se realizó un diagnóstico diferencial de
25 infarto de miocardio (transmural) de la pared anterior del anterior. Tras la estabilización del individuo con nitroglicerina y estreptoquinasa, se administraron al individuo 1×10^8 a 5×10^8 AMDAC en solución salina al 0,9 % directamente en la zona afectada usando una jeringa cardíaca con anestesia local. Se controló al individuo en sala de urgencias durante las siguientes 72 horas. Se controló al individuo adicionalmente durante los siguientes tres meses después del
30 tratamiento mediante electrocardiogramas y técnicas de visualización con colorantes para evaluar la extensión de la revascularización del área infartada. Se estableció la eficacia terapéutica si los resultados del electrocardiograma están perceptiblemente más cerca de lo normal antes de la administración de las AMDAC, o si el área infartada, tal como se visualizó, está perceptiblemente revascularizada.

35 6.6.2 Tratamiento de la cardiomiopatía

Un individuo presenta disnea, hinchazón de piernas y tobillos, y latidos cardíacos irregulares. Tras excluir otras causas, y con un electrocardiograma confirmatorio, se realizó un diagnóstico de cardiomiopatía. Un sonograma confirmó que el individuo tenía cardiomiopatía congestiva. Se administraron al individuo 1×10^8 a 5×10^8 AMDAC en solución salina al 0,9 % directamente a la arteria cardíaca utilizando una jeringa cardíaca con anestesia local. Se controló al individuo
40 durante los siguientes tres meses para determinar los cambios en las lecturas del sonograma indicando un flujo de sangre más normal, y para la mejora en la sensación de disnea y reducción en la hinchazón de piernas y tobillos. Se estableció la eficacia terapéutica para el individuo si cualquiera de estos signos muestran una mejora durante el periodo de control.

45 6.6.3 Tratamiento de enfermedad vascular periférica

Un individuo presenta frío, hormigueo de pies que se vuelven rojos tras balancear, y dolor, debilidad y cansancio en las piernas. Tras excluir la diabetes, se realizó un diagnóstico de enfermedad de las arterias periféricas. Se administraron al individuo 1×10^9 a 5×10^9 AMDAC por vía intravenosa en 450 ml de solución salina al 0,9 %, y se controló quincenalmente durante los siguientes tres meses. Se estableció la eficacia terapéutica si cualquiera de los
50 síntomas descritos anteriormente mejora durante el periodo de control.

55 6.6.4 Tratamiento de enfermedad vascular periférica

Un individuo presenta frío, hormigueo de pies que se vuelven rojos tras balancear, y dolor, debilidad y cansancio en las piernas. Tras excluir la diabetes, se realizó un diagnóstico de enfermedad de las arterias periféricas. Se administraron al individuo 1×10^8 a 5×10^8 AMDAC por vía intramuscular en 5 ml de solución salina al 0,9 %, y/o una cantidad equivalente por vía intravenosa o intraarterial, localmente entre los dedos del pie, y se controlaron quincenalmente durante los siguientes tres meses. Se estableció la eficacia terapéutica si cualquiera de los síntomas
60 descritos anteriormente mejora durante el periodo de control.

65 6.6.5 Tratamiento combinado de la enfermedad vascular periférica

Un individuo presenta frío, hormigueo de pies que se vuelven rojos tras balancear, y dolor, debilidad y cansancio en las piernas. Tras excluir la diabetes, se realizó un diagnóstico de enfermedad de las arterias periféricas. Se administraron al individuo 1×10^9 a 5×10^9 AMDAC por vía intravenosa en 450 ml de solución salina al 0,9 %, y se

controló quincenalmente durante los siguientes tres meses. Se prescribió también al individuo Cilostazol, 100 mg, para tomarse dos veces al día. Se estableció la eficacia terapéutica si cualquiera de los síntomas descritos anteriormente mejora durante el periodo de control.

5 **6.6.6 Tratamiento combinado de enfermedad vascular periférica**

10 Un individuo presenta frío, hormigueo en el pie derecho se vuelve rojo tras balancear, y dolor, debilidad y cansancio en la pierna derecha. Tras excluir la diabetes, se realizó un diagnóstico de enfermedad de las arterias periféricas. Se administró al individuo, el individuo experimenta angioplastia y cirugía para implantar una endoprótesis vascular en la arteria femoral. Se administraron posteriormente al individuo 1×10^9 a 5×10^9 AMDAC por vía intravenosa en 450 ml de solución salina al 0,9 %, y se controló quincenalmente durante los siguientes tres meses. Se estableció la eficacia terapéutica si cualquiera de los síntomas descritos anteriormente mejora durante el periodo de control.

15 **6.6.7 Tratamiento del ictus usando AMDAC**

20 Un varón de 52 años de edad presenta hemiplegia en el lado izquierdo del cuerpo, y afasia parcial. Se realiza un diagnóstico de cáncer colorrectal. Tras localizar el área de la isquemia utilizando diagnóstico por imágenes de resonancia magnética, se preparó al individuo para la cirugía para crear una abertura en el cráneo en el lado afectado. Una vez que se realizó la abertura, se administraron 5×10^7 a 1×10^8 AMDAC en 1-2 ml de solución salina al 0/9 % al área isquémica. Se controló al individuo durante los siguientes 7-14 días para determinar los signos de mejora en cualquier síntoma del ictus, particularmente hemiplegia o afasia. Se estableció la eficacia terapéutica si cualquiera de los síntomas descritos anteriormente mejora durante el periodo de control.

25 **6.6.8 Tratamiento del ictus usando AMDAC**

30 Un varón de 52 años de edad presenta hemiplegia en el lado izquierdo del cuerpo, y afasia parcial. Se realiza un diagnóstico de cáncer colorrectal. Tras localizar el área de la isquemia utilizando diagnóstico por imágenes de resonancia magnética, se preparó al individuo para la cirugía para crear una abertura en el cráneo en el lado afectado. Una vez que se realizó la abertura, se administraron 1×10^9 a 5×10^9 AMDAC en 450 ml de solución salina al 0/9 % al área isquémica. Se controló al individuo durante los siguientes 7-14 días para determinar los signos de mejora en cualquier síntoma del ictus, particularmente hemiplegia o afasia. Se estableció la eficacia terapéutica si cualquiera de los síntomas descritos anteriormente mejora durante el periodo de control.

REIVINDICACIONES

1. Una población aislada de células, en la que al menos un 50 % de las células son células adherentes derivadas del amnios, en donde dichas células adherentes derivadas del amnios se adhieren al plástico del cultivo de tejidos, y en donde dichas células adherentes derivadas del amnios son OCT-4⁻ (proteína 4 de unión a octámero) como se determina mediante la RT-PCR y CD49f⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD117⁻ y HLA-G⁻ como se puede determinar mediante citometría de flujo.
2. La población aislada de células de la reivindicación 1, en la que dichas células adherentes derivadas del amnios son VEGFR1/Flt-1⁺ (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular) y VEGFR2/KDR⁺ (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular) como se determina mediante inmunolocalización.
3. La población aislada de células de la reivindicación 1, en la que dichas células adherentes derivadas del amnios son una o más de CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺ (receptor de la angiopoyetina), TEM-7⁺ (marcador 7 endotelial tumoral), CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻ (enzima convertidora de la angiotensina-I, ACE), CD146⁻ (molécula de adhesión celular a melanoma) o CXCR4⁻ (receptor 4 de la quimioquina (motivo C-X-C)) como se determina mediante inmunolocalización.
4. La población aislada de células de la reivindicación 1, en la que dichas células adherentes derivadas del amnios son CD9⁺, CD10⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD98⁺, Tie-2⁺ (receptor de la angiopoyetina), TEM-7⁺ (marcador 7 endotelial tumoral), CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, CD143⁻, CD146⁻ y CXCR4⁻ como se determina mediante inmunolocalización.
5. La población aislada de células de la reivindicación 1, en la que dichas células adherentes derivadas del amnios son VE-caderina⁻ como se determina mediante inmunolocalización.
6. La población aislada de células de la reivindicación 1, en la que dichas células adherentes derivadas del amnios son adicionalmente positivas para CD200⁺ como se determina mediante inmunolocalización.
7. La población aislada de células de la reivindicación 1, en la que dichas células adherentes derivadas del amnios no expresan CD34 como es detectable mediante inmunolocalización tras exposición a 50 ng/ml de VEGF durante 7 días.
8. La población aislada de células de las reivindicaciones 1 o 2, en la que al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de las células en dicha población son células adherentes derivadas del amnios.
9. La población aislada de células de la reivindicación 1, en donde la población aislada de células comprende un segundo tipo de célula, en donde dicho segundo tipo de célula es una célula sanguínea, una célula madre aislada de sangre periférica, una célula madre aislada de sangre placentaria, una célula madre aislada de perfusato placentario, una célula madre aislada de tejido placentario, una célula madre aislada de sangre de cordón umbilical, una célula madre del cordón umbilical, una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea, una célula del estroma mesenquimal derivada de médula ósea, una célula madre hematopoyética, una célula madre somática, un condrocito, un fibroblasto, una célula muscular, una célula endotelial, un angioblasto, una célula precursora endotelial, un pericito, un cardiomiocito, un miocito, un cardiomioblasto, o un mioblasto.
10. La población aislada de células de la reivindicación 9, en la que dicho segundo tipo de célula comprende al menos un 10 % de las células en dicha población o al menos un 25 % de las células en dicha población.
11. La población aislada de células de la reivindicación 9, en la que dicho segundo tipo de célula es una célula madre o precursora hematopoyética.
12. La población aislada de células de la reivindicación 11, en la que dicha célula madre o precursora hematopoyética es una célula CD34⁺.
13. Una matriz o estructura principal descelularizada o sintética permanente o degradable que comprende las poblaciones de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. La matriz o estructura principal de la reivindicación 13, en la que dicha matriz o estructura principal es una membrana amniótica; una matriz extracelular deshidratada; colágeno placentario o membrana extracelular placentaria.
15. Una población aislada de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno del sistema circulatorio en un individuo.
16. Una población aislada de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor del SNC.
17. Una población aislada de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en

un método para tratar a un individuo que tiene una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor de una extremidad.

- 5 18. Uso de la población de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en la fabricación de una composición para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o un trastorno, en donde dicha enfermedad o dicho trastorno son una enfermedad o un trastorno del sistema circulatorio, una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor del SNC, o una alteración del flujo sanguíneo en o alrededor de una extremidad.

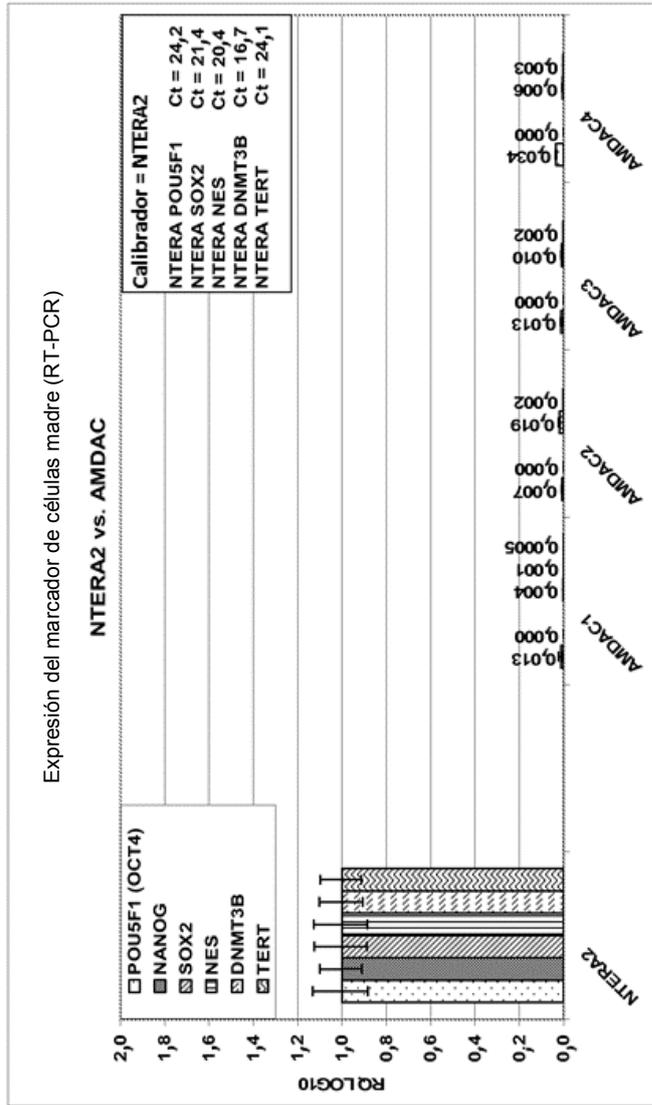


FIG. 1

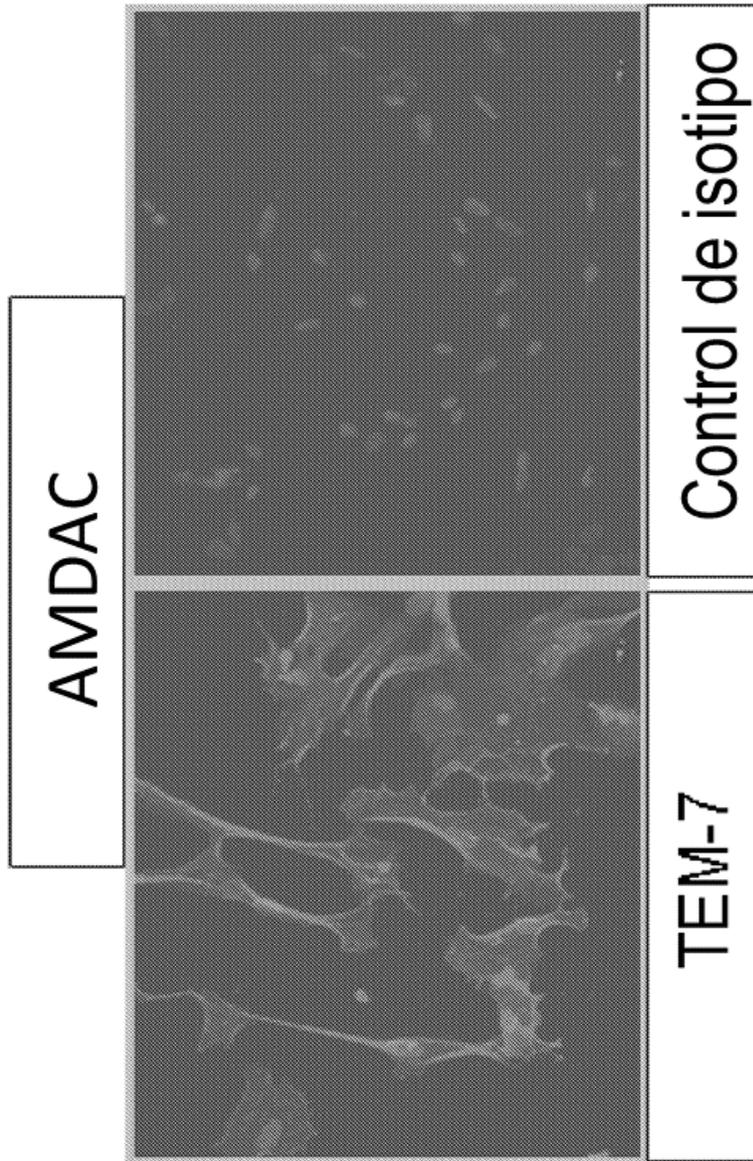
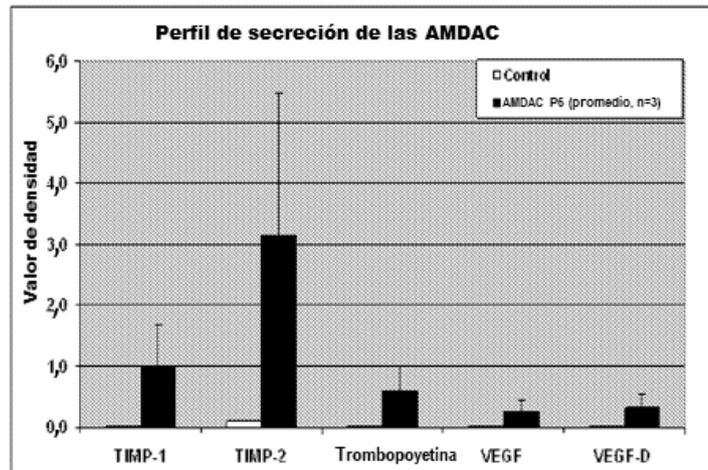
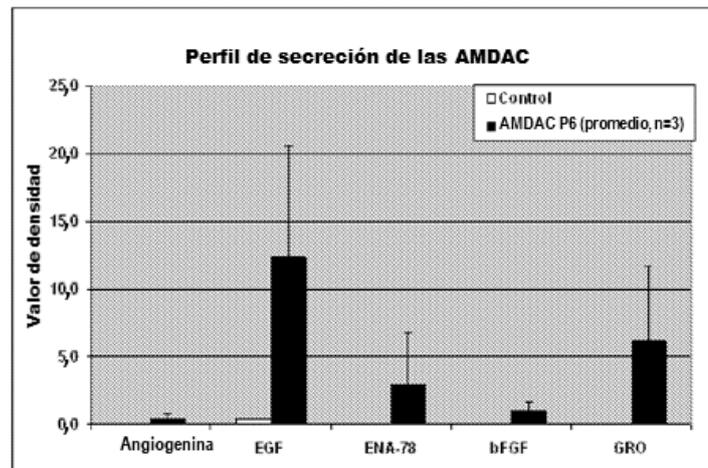


FIG. 2

A

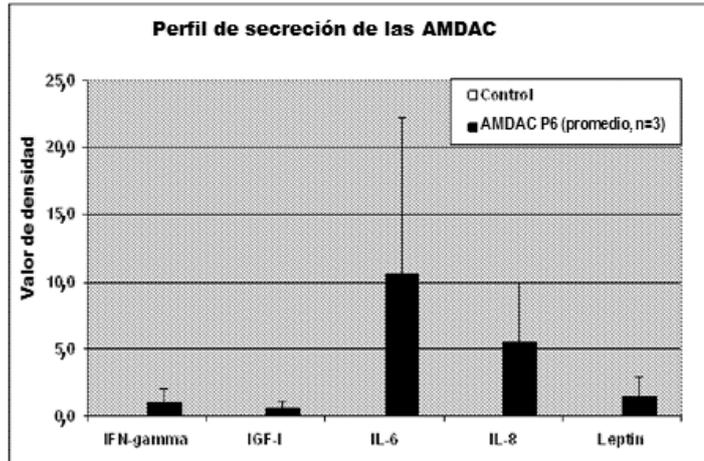


B

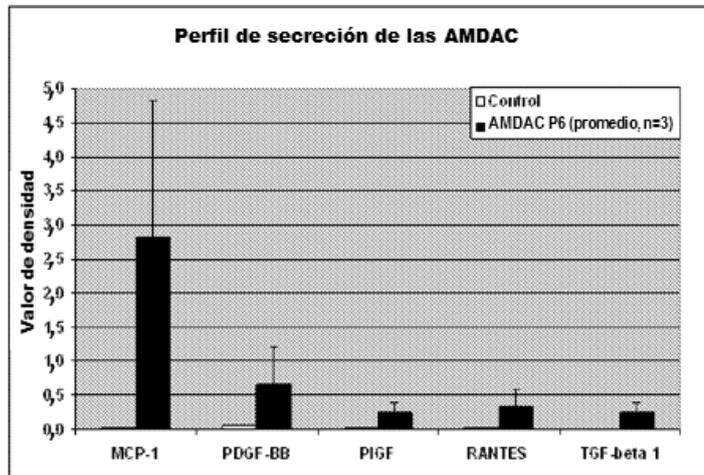


FIGS. 3A, 3B

C



D



FIGS. 3C, 3D

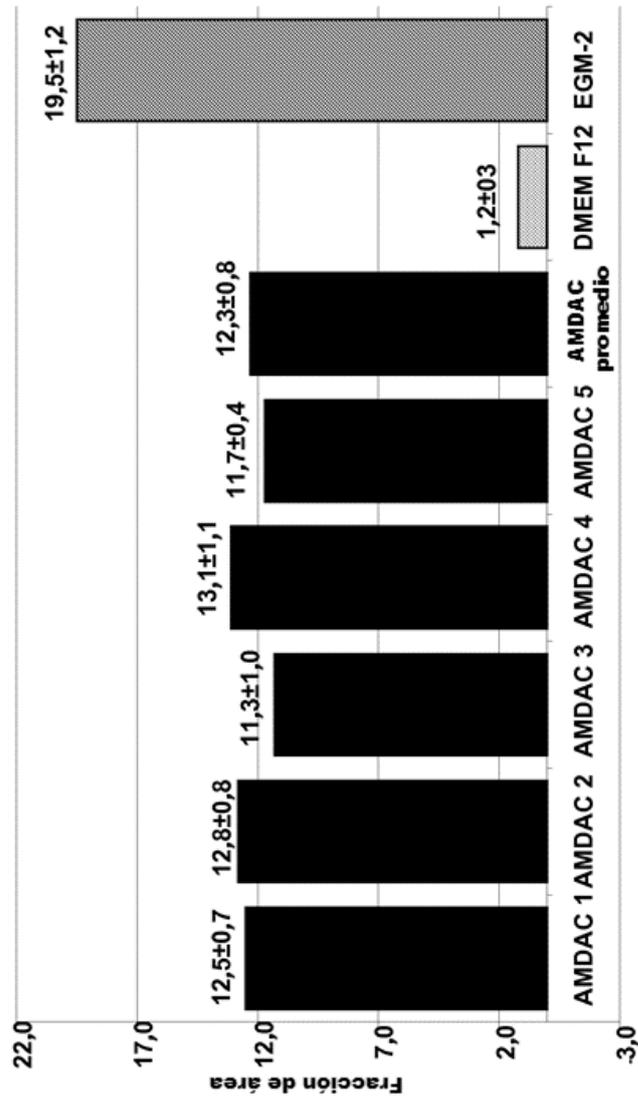


FIG. 4



FIG. 5

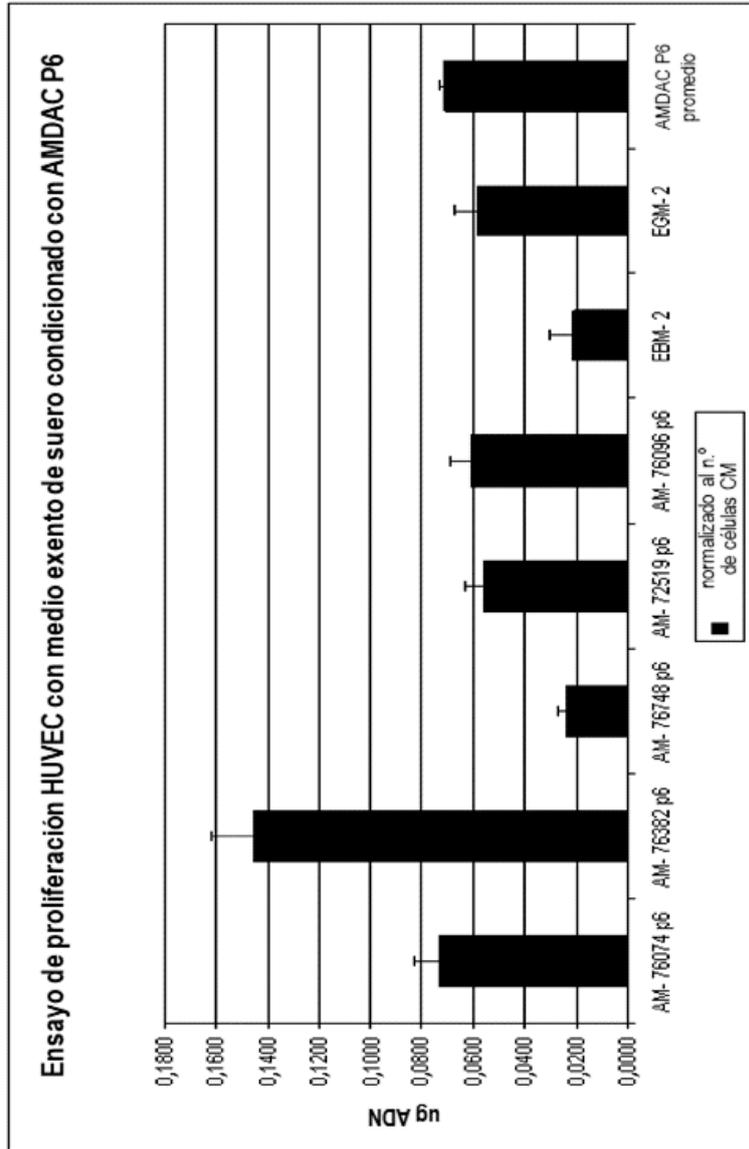


FIG. 6

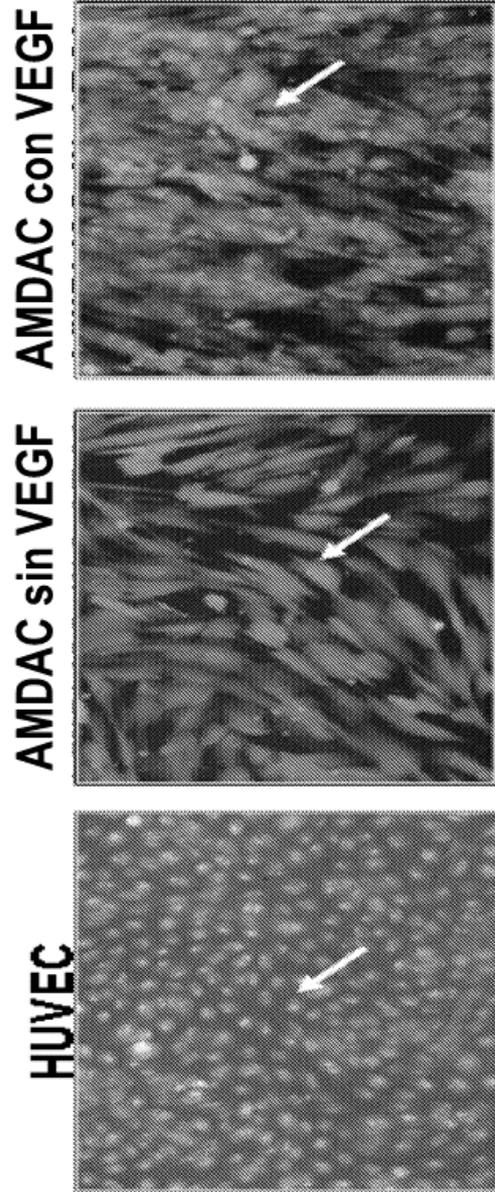


FIG. 7

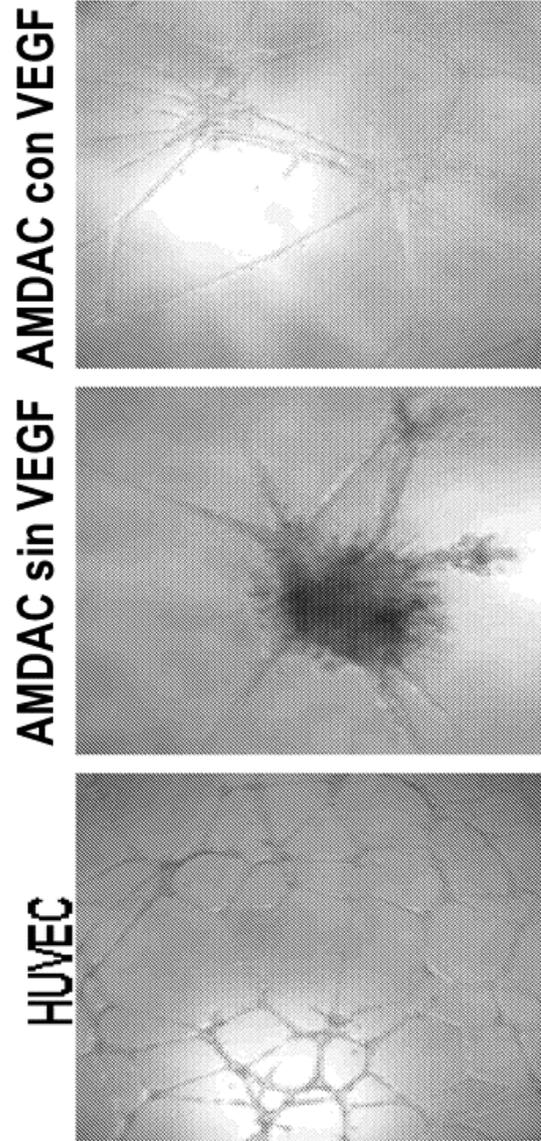


FIG. 8

Perfil de secreción de AMDAC con hipoxia

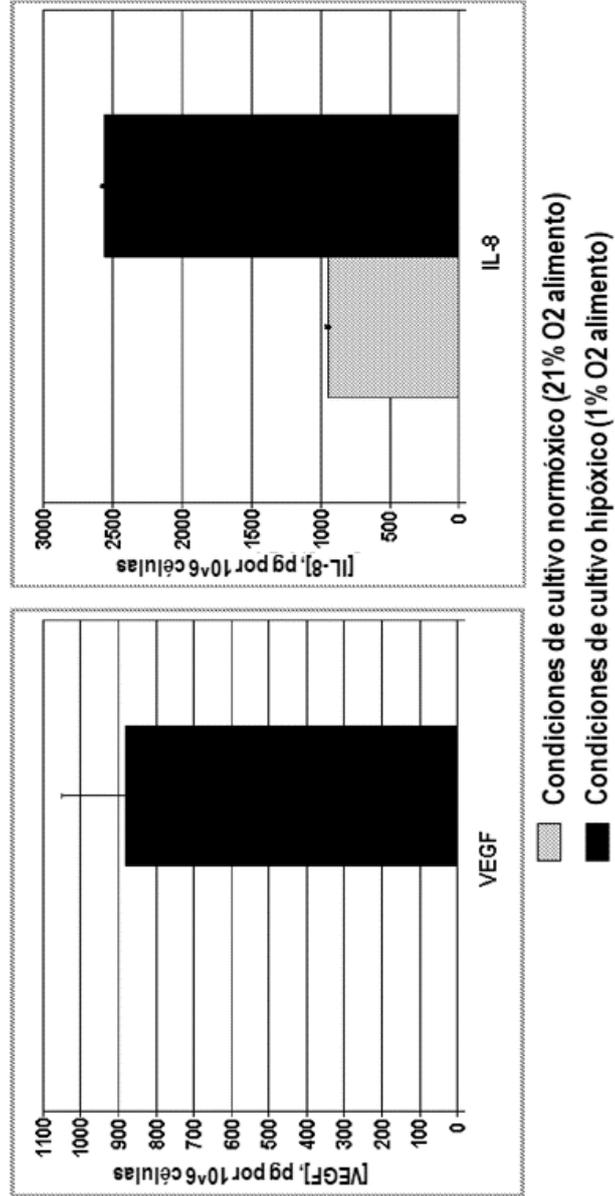


FIG. 9

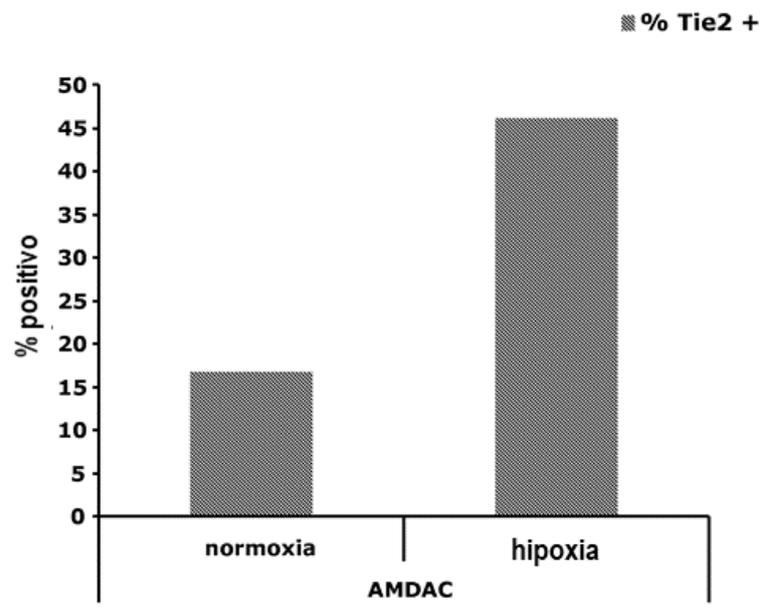


FIG. 10

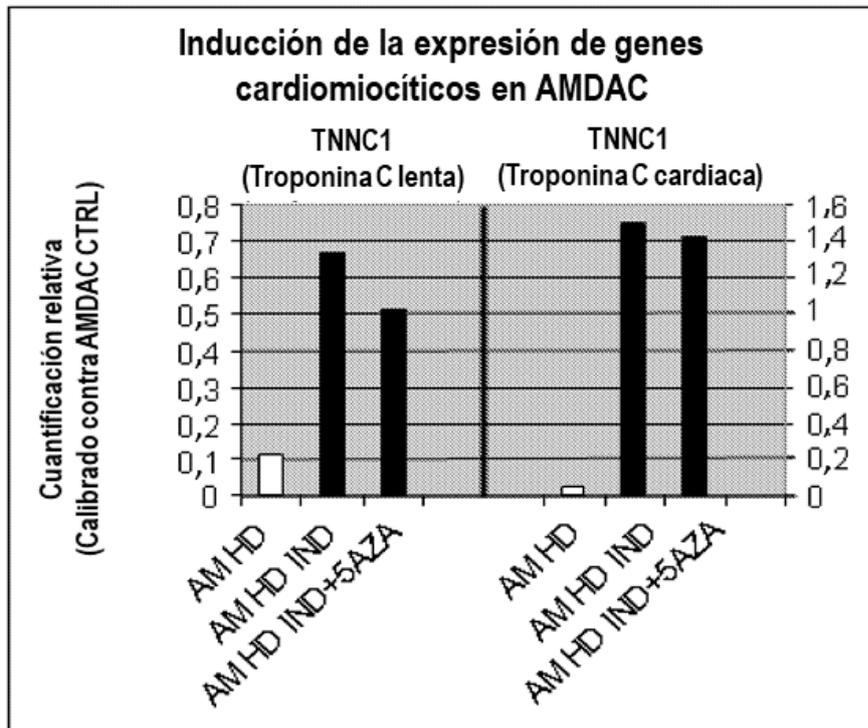


FIG. 11

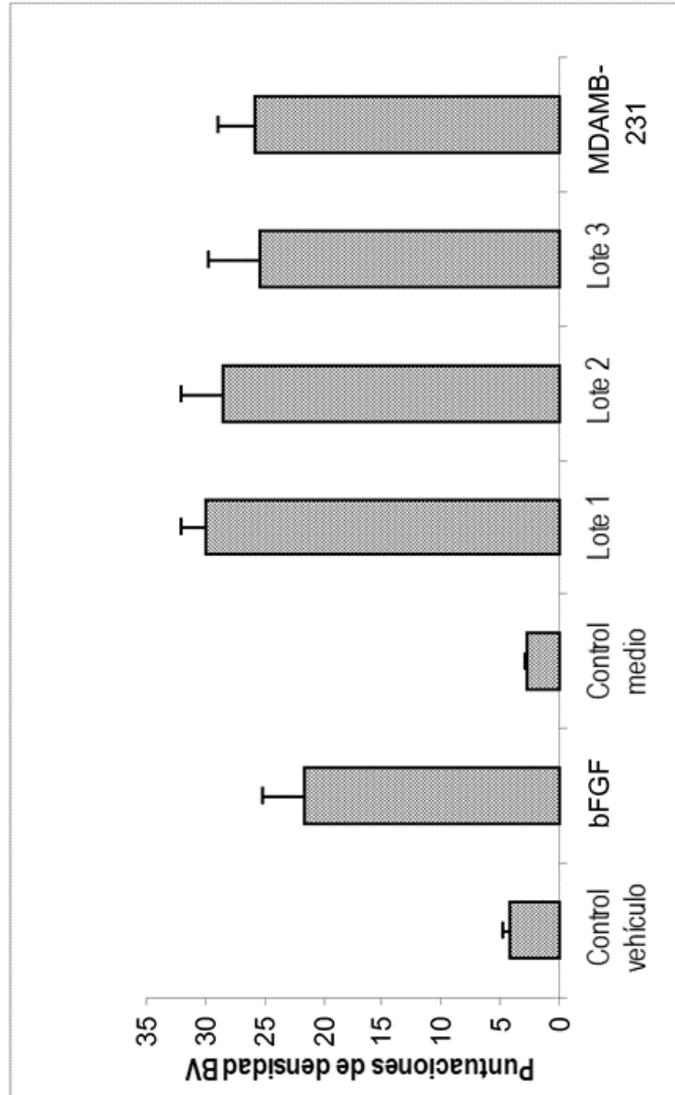


FIG. 12

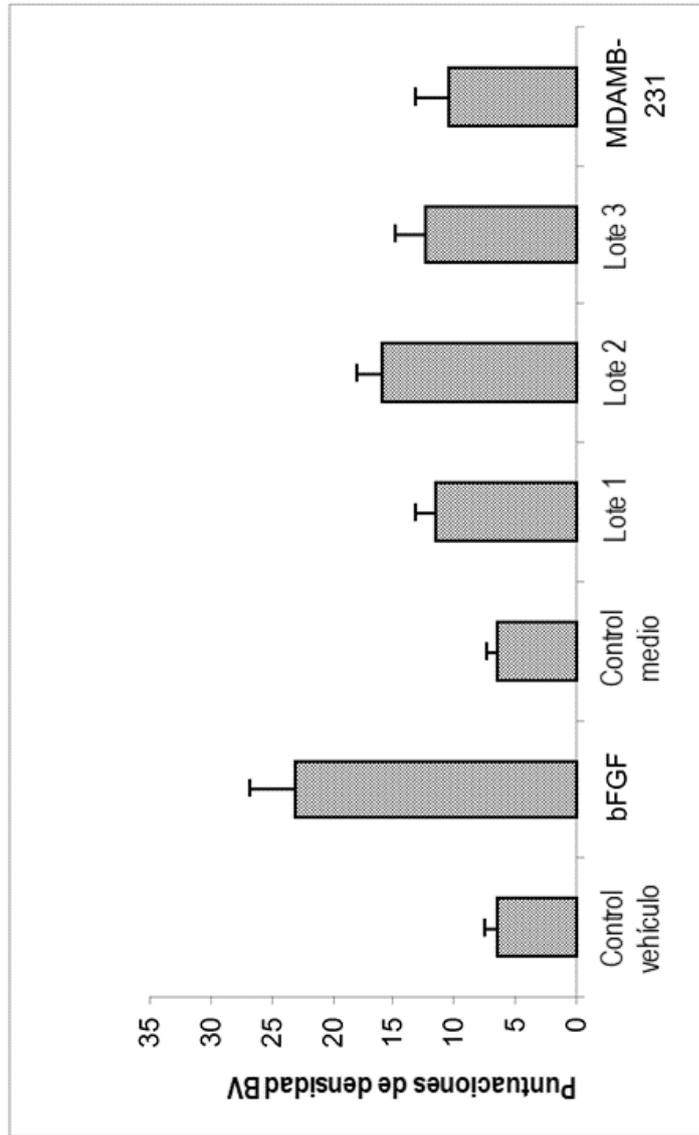
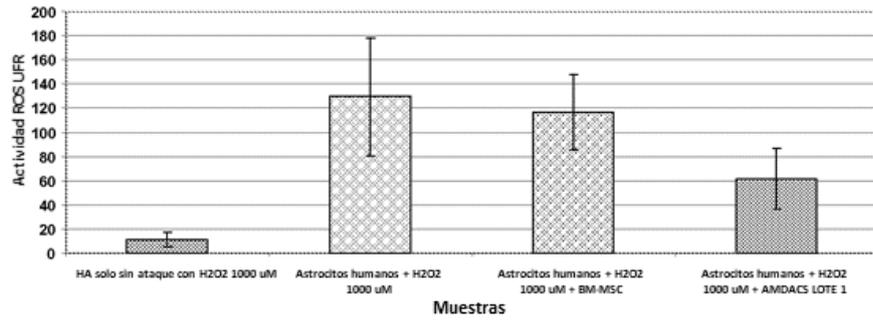
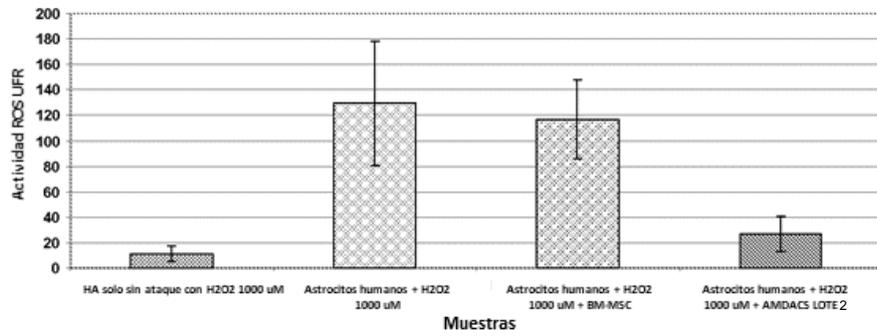


FIG. 13

A



B



FIGS. 14A, 14B