

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 579**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/50** (2015.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012 PCT/US2012/040081**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12166844**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12792203 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2714059**

54 Título: **Tratamiento del dolor usando citoblastos placentarios**

30 Prioridad:

**01.06.2011 US 201161492314 P**

**18.10.2011 US 201161548663 P**

**03.02.2012 US 201261594985 P**

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

**04.04.2019**

73 Titular/es:

**CELULARITY, INC. (100.0%)**

**33 Technology Drive**

**Warren, NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**HERZBERG, URI y**

**GURNEY, JODI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 707 579 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

Tratamiento del dolor usando citoblastos placentarios

**1. CAMPO**

5 En general, la invención se refiere a citoblastos placentarios para uso en métodos de tratamiento de individuos que tienen dolor neuropático.

**2. ANTECEDENTES**

10 Debido a que las placentas de mamífero son numerosas y normalmente se desechan como residuos médicos, representan una fuente única de citoblastos útiles médicamente. Existe la necesidad en el campo médico de composiciones y métodos mejorados de supresión del dolor. Como tales, se proporcionan en la presente memoria citoblastos placentarios, y composiciones que comprenden citoblastos placentarios, útiles en el tratamiento del dolor, y métodos de uso de los mismos para tratar el dolor.

La publicación de solicitud internacional nº WO 2008/100498 A2 se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad inmunorrelacionada, basado en el uso de citoblastos placentarios o citoblastos de cordón umbilical.

15 La publicación de solicitud internacional nº WO 2010/026574 A2 se refiere a un método de cultivo de células adherentes de una placenta o tejido adiposo que pueden usarse para tratar una afección que puede beneficiarse del trasplante de células u órganos.

La publicación de solicitud internacional nº WO 2008/036374 A2 se refiere a métodos, células y composiciones para efectuar trasplantes de citoblastos en pacientes que se han inmunosuprimido anteriormente.

20 La publicación de solicitud internacional nº WO 2007/136673 A2 se refiere a métodos y composiciones para tratar o mejorar el dolor lumbar, basados en el uso de uno o más tipos celulares.

Xin Li et al. (23 de noviembre de 2010) se refiere al uso de células adherentes derivadas de placenta (PADC) para el tratamiento de mieloma múltiple.

La publicación de solicitud internacional nº WO 2011/094181 A1 se refiere a un método de tratamiento de cánceres relacionados con huesos, p. ej. mieloma múltiple, usando células adherentes placentarias osteogénicas (OPAC).

25 La publicación de solicitud internacional nº WO 2006/133128 A2 se refiere a un método de reducción del dolor, en el que el método comprende administrar a un sujeto necesitado de ello un inhibidor seleccionado del grupo consistente en un inhibidor de Epac, un inhibidor de fosfolipasa C-ε (PLC-ε) y un inhibidor de fosfolipasa D (PLD).

**3. COMPENDIO**

30 La presente invención proporciona citoblastos placentarios para uso en un método de tratamiento de dolor neuropático causado por neuropatía diabética en un individuo, en el que los citoblastos placentarios son citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>.

35 En una realización, la presente invención comprende adicionalmente determinar uno o más primeros niveles de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichos citoblastos placentarios, y determinar uno o más segundos niveles de dolor en dicho individuo después de la administración de dichos citoblastos placentarios, en la que dichos citoblastos placentarios reducen dichos uno o más segundos niveles de dicho dolor en comparación con dichos uno o más primeros niveles de dolor. En otra realización, dichos uno o más primeros niveles de dolor y dichos uno o más segundos niveles de dolor se determinan mediante una escala de valoración del dolor. En una realización específica, dicha escala de valoración del dolor es la escala numérica de intensidad del dolor, la escala de valoración de la calidad del dolor, la escala descriptiva simple de intensidad del dolor, la escala analógica visual, la escala de calificación del dolor FACES de WongBaker, la escala FLACC, la escala CRIES, la escala COMFORT o la medida del dolor evocado inducido al someter el paciente a estímulos de frío, calor o mecánicos. En otra realización, la presente invención comprende determinar un primer nivel de uno o más indicios fisiológicos de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichos citoblastos placentarios, y determinar un segundo nivel de uno o más indicios fisiológicos de dolor en dicho individuo después de la administración de dichos citoblastos placentarios, en la que dichos citoblastos placentarios reducen dicho segundo nivel en comparación con dicho primer nivel. En una realización específica, dicho indicio fisiológico de dolor es: (i) ritmo cardiaco en el individuo; (ii) presión sistólica de dicho individuo o (iii) presión diastólica de dicho individuo.

50 En una realización de la presente invención, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>. En otra realización, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>. En todavía otra realización, dichos citoblastos placentarios no expresan HLA-G; o expresan CD73; o expresan OCT-4; o expresan CD73 y no expresan HLA-G. En una realización específica, dichos citoblastos placentarios son HLA-A,B,C<sup>+</sup>.

5 En otra realización de la presente invención, dichos citoblastos placentarios expresan el gen ELOVL2, ST3GAL6, ST6GALNAC5 o SLC12A8 a un nivel detectablemente mayor que un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea. En todavía otra realización, dichos citoblastos placentarios expresan el gen ARTS-1, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 o TGFB2 a un nivel detectablemente mayor que un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea.

En una realización de la presente invención, dicho dolor es insensible a: (i) terapia esteroidea; (ii) terapia antiinflamatoria no esteroidea; (iii) terapia opioidea o (iv) terapia opiácea. En otra realización, dichos citoblastos placentarios se formulan para administrarse por vía local, sistémica, intravenosa o intraarterial.

10 La solicitud se refiere en general a un método de tratamiento del dolor, o de condiciones sensoriales anormales tales como disestesia, alodinia e hiperalgesia, en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios, o de medio de cultivo acondicionado por citoblastos placentarios, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una mejora detectable de dicho dolor. Específicamente, la invención proporciona citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> para uso en un método para tratar dolor neuropático causado por neuropatía diabética en un individuo. En otra realización específica, la presente invención comprende adicionalmente determinar uno o más primeros niveles de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichos citoblastos placentarios, y determinar uno o más segundos niveles de dolor en dicho individuo después de la administración de dichos citoblastos placentarios, en la que dicha cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentario reduce dichos uno o más segundos niveles de dicho dolor en comparación con dichos uno o más primeros niveles de dolor. En una realización más específica, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios da como resultado una mejora detectable de dicho dolor que es mayor, o más duradera, que la mejora debida a la administración de un placebo. En una realización más específica, dichos uno o más primeros niveles de dolor y dichos uno o más segundos niveles de dolor se determinan mediante una escala de valoración del dolor. En una realización más específica, dicha escala de valoración del dolor es la escala numérica de intensidad del dolor, la escala de valoración de la calidad del dolor, la escala descriptiva simple de intensidad del dolor, la escala analógica visual, la escala de calificación del dolor FACES de Wong-Baker, la escala FLACC, la escala CRIES o la escala COMFORT.

30 En otra realización específica, la presente invención comprende adicionalmente determinar un primer nivel de uno o más indicios fisiológicos de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichos citoblastos placentarios, y determinar un segundo nivel de uno o más indicios fisiológicos de dolor en dicho individuo después de la administración de dichos citoblastos placentarios, en la que dicha primera cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios reduce dicho segundo nivel en comparación con dicho primer nivel. En una realización más específica, dicho indicio fisiológico de dolor es el ritmo cardiaco en el individuo. En una realización más específica, dicho ritmo cardiaco en dicho individuo es menor después de dicha administración en comparación con dicho ritmo cardiaco en dicho individuo antes de dicha administración. En otra realización más específica, dicho indicio fisiológico de dolor es la presión sistólica de dicho individuo. En una realización más específica, dicha presión sistólica de dicho individuo es menor después de dicha administración en comparación con dicha presión sistólica en dicho individuo antes de dicha administración. En otra realización más específica, dicho indicio fisiológico de dolor es la presión diastólica de dicho individuo. En una realización más específica, dicha presión diastólica de dicho individuo es menor después de dicha administración en comparación con dicha presión diastólica en dicho individuo antes de dicha administración.

40 En el contexto de la presente invención, el dolor es dolor neuropático causado por neuropatía diabética. En algunos aspectos, dicho dolor neuropático está causado por lesión en un nervio en dicho individuo. En otros aspectos, dicho dolor neuropático está causado por un fármaco. En ciertos aspectos, dicho fármaco es o comprende un fármaco anticanceroso que contiene platino, p. ej. p. ej., oxaliplatino, carboplatino o cisplatino, u otro fármaco quimioterapéutico tal como paclitaxel o vincristina. En otro aspecto, el dolor neuropático está causado por un virus, p. ej. una enfermedad vírica tal como varicela zóster, herpes (p. ej., herpes simple) o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En todavía otro aspecto, el dolor está causado por lesión por radiación, p. ej. lesión por radiación que es parte del tratamiento del cáncer. En otro aspecto específico, dicho dolor neuropático está causado por inflamación, p. ej. neuroinflamación o neuritis.

50 En otro aspecto del método de tratamiento del dolor, dicho dolor es dolor inflamatorio. En otra realización, dicho dolor es dolor óseo. En un aspecto específico, dicho dolor óseo está asociado a o causado por cáncer. En otro aspecto, dicho dolor está causado por cáncer. En otro aspecto, dicho dolor está causado por o asociado a vulvodinia. En otro aspecto, dicho dolor está causado por o asociado a cistitis intersticial. En una realización, dicho dolor es insensible a la terapia esteroidea. En otra realización, dicho dolor es insensible a la terapia antiinflamatoria no esteroidea. En otra realización, dicho dolor es insensible a la terapia opioidea. En otra realización, dicho dolor es insensible a la terapia opiácea.

60 En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria una cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> para uso en el tratamiento de dolor neuropático causado por neuropatía diabética en un individuo, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una mejora detectable de dicho dolor. En una realización, dicho nivel de dolor en dicho individuo antes de dicho uso y dicho nivel de dolor en el individuo después de dicho uso se determinan por una escala de valoración del dolor, p. ej. la

escala numérica de intensidad del dolor, la escala de valoración de la calidad del dolor, la escala descriptiva simple de intensidad del dolor, la escala analógica visual, la escala de calificación del dolor FACES de Wong-Baker, la escala FLACC, la escala CRIES o la escala COMFORT. En otra realización, dicho nivel de dolor en dicho individuo antes de dicho uso y dicho nivel de dolor en el individuo después de dicho uso se determinan por uno o más indicios fisiológicos de dolor. En una realización específica, dicho indicio fisiológico de dolor es el ritmo cardiaco en el individuo, p. ej. dicho ritmo cardiaco en dicho individuo es menor después de dicho uso que antes de dicho uso. En otra realización específica, dicho indicio fisiológico de dolor es la presión sistólica de dicho individuo, p. ej. dicha presión sistólica en dicho individuo es menor después de dicho uso que antes de dicho uso. En otra realización específica, dicho indicio fisiológico de dolor es la presión diastólica de dicho individuo, p. ej. dicha presión diastólica en dicho individuo es menor después de dicho uso que antes de dicho uso. En ciertas realizaciones, dicho dolor es dolor neuropático. En una realización más específica, dicho dolor neuropático está causado por neuropatía diabética. En otros aspectos, dicho dolor neuropático está causado por lesión en un nervio de dicho individuo. En otro aspecto, dicho dolor neuropático está causado por inflamación. En otro aspecto, dicho dolor neuropático está causado por un fármaco. En otro aspecto, dicho fármaco es o comprende un fármaco anticanceroso que contiene platino, p. ej. un fármaco anticanceroso que contiene platino es o comprende oxaliplatino, carboplatino o cisplatino. En otro aspecto, dicho fármaco es o comprende paclitaxel. En otros aspectos, dicho dolor es dolor inflamatorio, dolor óseo (p. ej., dolor óseo asociado a o causado por cáncer), dolor causado por cáncer, dolor causado por o asociado a vulvodinia, dolor causado por o asociado a cistitis intersticial o dolor causado por enfermedad articular degenerativa tal como artrosis. En ciertas realizaciones, dicho dolor es insensible a terapia esteroidea. En ciertas otras realizaciones, dicho dolor es insensible a terapia antiinflamatoria no esteroidea. En ciertas otras realizaciones, dicho dolor es insensible a terapia opioidea. En ciertas otras realizaciones, dicho dolor es insensible a terapia opioidea no específica o mu/delta mixta.

En el contexto de la presente invención, dichos citoblastos placentarios son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y adicionalmente CD200<sup>+</sup>, p. ej. los citoblastos placentarios son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En una realización más específica, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>. En una realización más específica, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>. En otras realizaciones específicas, dichos citoblastos placentarios no expresan HLA-G; o expresan CD73; o expresan OCT-4; o expresan CD73 y no expresan HLA-G. En una realización específica de cualquiera de los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria, dichos citoblastos placentarios son HLA-A,B,C<sup>+</sup>. En realizaciones específicas de cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente OCT-4<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios se formulan para administrarse por vía local. En ciertas otras realizaciones, dichos citoblastos placentarios se formulan para administrarse por vía sistémica, p. ej. intravenosa o intraarterial.

### 3.1 DEFINICIONES

Como se usa en la presente memoria, el término “aproximadamente”, cuando hace referencia a un valor numérico declarado, indica un valor más o menos el 10 % del valor numérico declarado.

Como se usa en la presente memoria, el término “derivado” significa aislado de o purificado de otro modo. Por ejemplo, las células adherentes derivadas de placenta se aíslan de la placenta. El término “derivado” engloba células que se cultivan a partir de células derivadas directamente de un tejido, p.ej. la placenta, y células cultivadas o expandidas a partir de aislamientos primarios.

Como se usa en la presente memoria, “inmunolocalización” significa la detección de un compuesto, p. ej. un marcador celular, usando una proteína inmunitaria, p. ej. un anticuerpo o fragmento del mismo en, por ejemplo, citometría de flujo, clasificación celular activada por fluorescencia, clasificación celular magnética, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica o similares.

Como se usa en la presente memoria, el término “SH2” hace referencia a un anticuerpo que se une a un epítipo en el marcador CD105. Por tanto las células a la que se hace referencia como SH2<sup>+</sup> son CD105<sup>+</sup>.

Como se usa en la presente memoria, los términos “SH3” y “SH4” hacen referencia a anticuerpos que se unen a epítopos presentes en el marcador CD73. Por tanto, las células a la que se hace referencia como SH3<sup>+</sup> y/o SH4<sup>+</sup> son CD73<sup>+</sup>.

Como se usa en la presente memoria, un citoblasto está “aislado” si se retiran del citoblasto al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos un 99 % de las demás células con las que el citoblasto está naturalmente asociado, p. ej. durante la recogida y/o cultivo del citoblasto. Una población de células “aisladas” significa una población de células que están sustancialmente separadas de las demás células del tejido, p. ej. placenta, del que deriva la población de células. En algunas realizaciones, una población de, p. ej., citoblastos está “aislada” si se retiran de la población de citoblastos al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos un 99 % de las células con las que la población de citoblastos está naturalmente asociada, p. ej. durante la recogida y/o cultivo de la población de citoblastos.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “citoblasto placentario” hace referencia a un citoblasto o célula progenitora que deriva de, p. ej. se aísla de, una placenta de mamífero, independientemente del número de pases después de un cultivo primario, que se adhiere a un sustrato de cultivo de tejido (p. ej. plástico de cultivo de tejido o

placa de cultivo de tejido recubierta con fibronectina). La expresión "citoblasto placentario" como se usa en la presente memoria, no hace referencia sin embargo a un trofoblasto, citotrofoblasto, célula germinal embrionaria o citoblasto embrionario, como se entienden estas células por los especialistas en la materia. Una célula se considera un "citoblasto" si la célula retiene al menos un atributo de un citoblasto, p. ej. un marcador o perfil de expresión génica asociado a al menos uno o más tipos de citoblastos; la capacidad de replicar al menos 10-40 veces en cultivo; multipotencia, p. ej. la capacidad de diferenciarse, *in vitro*, *in vivo* o ambos, a células de una o más de las tres capas germinales; la carencia de características celulares adultas (concretamente diferenciadas) o similares. Las expresiones "citoblasto placentario" y "citoblasto derivado de placenta" pueden usarse intercambiabilmente. A menos que se señale otra cosa en la presente memoria, el término "placentario" incluye el cordón umbilical. Los citoblastos placentarios divulgados en la presente memoria son, en ciertas realizaciones, multipotentes *in vitro* (es decir, las células se diferencian *in vitro* en condiciones de diferenciación), multipotentes *in vivo* (es decir, las células se diferencian *in vivo*), o ambos.

Como se usa en la presente memoria, un citoblasto es "positivo" de un marcador particular cuando ese marcador es detectable. Por ejemplo, un citoblasto placentario es positivo, p.ej. de CD73 porque CD73 es detectable en los citoblastos placentarios en una cantidad detectablemente mayor que el fondo (en comparación con, p. ej., un control isotópico o un control negativo experimental para cualquier ensayo dado). Una célula es también positiva de un marcador cuando ese marcador puede usarse para distinguir la célula de al menos otro tipo celular, o puede usarse para seleccionar o aislar la célula cuando se presenta en o expresa por la célula.

Como se usa en la presente memoria, "inmunomodulación" e "inmunomodulatorio" significan causar, o tener la capacidad de causar, un cambio detectable en una respuesta inmunitaria, y la capacidad de causar un cambio detectable en una respuesta inmunitaria.

#### 4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa la eficacia de citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, vehículo o gabapentina (GBP) en la reducción del dolor en un modelo de dolor neuropático. Eje X: condiciones; eje Y: mejora de la sensibilidad (alodinia) según el ensayo de variedad de filamentos de von Frey. "D": día. GBP: gabapentina. MPK: miligramos por kilogramo. BL: valor basal.

La Figura 2 representa el grado de alivio del dolor total (TOPAR) producido mediante la administración de citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (1 x 10<sup>6</sup>, 3 x 10<sup>6</sup> o 10 x 10<sup>6</sup> células/administración), vehículo o gabapentina (GBP) en el modelo animal de dolor neuropático. Los asteriscos indican resultados significativos en comparación con la administración de vehículo solo.

Las Figuras 3A-3D representan el efecto de citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> sobre la alodinia mecánica medido por una fuerza de 26 g de fibra de von Frey (A): frecuencia de retirada de la zarpa trasera en el miembro ipsilateral después de la administración de 4 x 10<sup>6</sup> citoblastos placentarios (cuadrados) y vehículo (rombos). (B): Frecuencia de retirada de la zarpa trasera en el miembro contralateral después de la administración de 4 x 10<sup>6</sup> citoblastos placentarios (cuadrados) y vehículo (línea continua). (C): Efecto dependiente de la dosis de citoblastos placentarios sobre la reducción de la alodinia mecánica en el miembro ipsilateral. (D): Efecto dependiente de la dosis de citoblastos placentarios sobre el porcentaje de pacientes con respuesta de reducción del dolor. \*P<0,05; \*\*p<0,01 frente a vehículo. Para las Figuras 3C y 3D, la primera barra (más a la izquierda) representa el vehículo; la segunda barra representa 4 x 10<sup>6</sup> citoblastos placentarios; la tercera barra representa 1 x 10<sup>6</sup> citoblastos placentarios y la cuarta barra (más a la derecha) representa 4 x 10<sup>5</sup> citoblastos placentarios.

Las Figuras 4A-4B demuestran que los citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> suprimen el reclutamiento, activación y diferenciación de células dendríticas en nódulos linfáticos de drenaje el día 4. (A): El grupo tratado con citoblastos placentarios tenía menor expresión de los genes CD11c, CD86 y CD80. (B): El grupo tratado con citoblastos placentarios tenía menor expresión del gen IL-12. \*P<0,05; \*\*p<0,01 frente a vehículo. Para las Figuras 4A y 4B, la primera barra (más a la izquierda) representa el vehículo; la segunda barra (más a la derecha) representa citoblastos placentarios.

Las Figuras 5A-5C demuestran que los citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> suprimen la activación de linfocitos T, la diferenciación modulada de linfocitos T y el perfil de citocinas. (A): El grupo tratado con citoblastos placentarios tenía menor expresión génica de CD3 y CD69 en nódulo linfático de drenaje el día 4. (B) El grupo tratado con citoblastos placentarios tenía una expresión génica de IFN $\gamma$  significativamente menor en nódulo linfático de drenaje el día 4. (C): El grupo tratado con linfocitos placentarios tenía mayor expresión génica de IL-10 pero menor de IL-17 en nódulo linfático de drenaje el día 4. \*P<0,05; \*\*p<0,01 frente a vehículo. Para las Figuras 5A, 5B y 5C, la primera barra (más a la izquierda) representa el vehículo; la segunda barra (más a la derecha) representa citoblastos placentarios.

Las Figuras 6A-6B demuestran que los citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PSC) suprimen la expresión de ARNm (A) y proteína (B) de IL-17 en nervio ciático ipsilateral el día 8. \*P<0,05 frente a vehículo.

Las Figuras 7A-7D demuestran que los citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> suprimen la

5 infiltración de células inmunitarias en nervio ciático ipsilateral el día 8. (A): Los citoblastos placentarios suprimían la infiltración (Emr1) y activación de macrófagos (CD68) de macrófagos. (B): Los citoblastos placentarios suprimían la infiltración (CD11c) y activación (CD80, IL-12b) de células dendríticas. (C): Los citoblastos placentarios suprimían la infiltración (CD3d) y activación (CD69) de linfocitos T. (D): El análisis de citometría de flujo de una suspensión monocelular de nervio ciático mostraba que los citoblastos placentarios suprimían la infiltración de linfocitos T (CD3) y macrófagos (ED2). \*P<0,05 frente a vehículo. Para las Figuras 7A, 7B y 7C, la primera barra (más a la izquierda) representa el vehículo; la segunda barra (más a la derecha) representa citoblastos placentarios. Para la Figura 7D, la primera barra (más a la izquierda) representa células no tratadas; la barra media representa el vehículo y la tercera barra (más a la derecha) representa citoblastos placentarios.

10 Las Figuras 8A-8L demuestran que los citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> suprimen los infiltrados inflamatorios en nervio ciático ipsilateral el día 8. Tinción con H y E (A-C), CD68 (D-F), CD8 (G-I) y CD4 (J-L) en animales normales, tratados con vehículo y tratados con citoblastos placentarios. Las flechas indican perineurio en A, B y C; los asteriscos indican epineurio. Amplificación: 100x, barra de escala 200 mM.

15 La Figura 9 demuestra que los citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> suprimen la expresión de ARNm de CCL2, CCL12 y CXCL1 en nervio ciático ipsilateral el día 8. La primera barra (más a la izquierda) representa el vehículo; la segunda barra (más a la derecha) representa citoblastos placentarios.

20 Las Figuras 10A-10D representan el número de respuestas a estímulos de 26 g en la zarpa de ratas a valor basal, después del procedimiento de lesión nerviosa (D6) y después del tratamiento (D10, D16, D25 y D30). (A) Se observó una reducción de dolor significativa después de la administración de citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> sobre el dolor inducido por CCl. (C) Se observó una reducción significativa del dolor después de la administración de citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> sobre el dolor inducido por CCl. (B, D) Se representa el efecto sobre la zarpa contralateral.

25 Las Figuras 11A-11B representan el periodo que pudieron permanecer las ratas sobre una varilla giratoria (hasta 180 segundos) a valor basal (BL), después del procedimiento de lesión nerviosa (D7) y después del tratamiento (D11, D21, D26 y D34). (A) Grupos tratados por vía intravenosa (IV) con citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y de control. (B) Grupos tratados por vía intramuscular (IM) con citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y de control.

## 5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 La presente invención proporciona citoblastos placentarios para uso en un método de tratamiento del dolor neuropático causado por neuropatía diabética en un individuo, en los que los citoblastos placentarios son citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>.

35 En una realización, la presente invención comprende adicionalmente determinar uno o más primeros niveles de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichos citoblastos placentarios, y determinar uno o más segundos niveles de dolor en dicho individuo después de la administración de dichos citoblastos placentarios, en la que dichos citoblastos placentarios reducen dichos uno o más segundos niveles de dicho dolor en comparación con dicho uno o más primeros niveles de dolor. En otra realización, dichos uno o más primeros niveles de dolor y dichos uno o más segundos niveles de dolor se determinan por una escala de valoración del dolor. En una realización específica, dicha escala de valoración del dolor es la escala numérica de intensidad del dolor, la escala de valoración de la calidad del dolor, la escala descriptiva simple de intensidad del dolor, la escala analógica visual, la escala de calificación del dolor FACES de Wong-Baker, la escala FLACC, la escala CRIES, la escala COMFORT y la medida del dolor evocado inducida sometiendo el paciente a estímulos de frío, calor o mecánicos. En otra realización, la presente invención comprende determinar un primer nivel de uno o más indicios fisiológicos de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichos citoblastos placentarios, y determinar un segundo nivel de uno o más indicios fisiológicos de dolor en dicho individuo después de la administración de dichos citoblastos placentarios, en la que dichos citoblastos placentarios reducen dicho segundo nivel en comparación con dicho primer nivel. En una realización específica, dicho indicio fisiológico de dolor es: (i) el ritmo cardiaco en el individuo; (ii) la presión sistólica de dicho individuo o (iii) la presión diastólica de dicho individuo.

40 En una realización de la presente invención, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>. En otra realización, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>. En todavía otra realización, dichos citoblastos no expresan HLA-G; o expresan CD73; o expresan OCT-4; o expresan CD73 y no expresan HLA-G. En una realización específica, dichos citoblastos placentarios son HLA-A,B,C<sup>+</sup>.

45 En otra realización de la presente invención, dichos citoblastos placentarios expresan los genes ELOVL2, ST3GAL6, ST6GALNAC5 o SLC12A8 a un nivel detectablemente mayor que un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea. En todavía otra realización, dichos citoblastos placentarios expresan los genes ARTS-1, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 o TGFB2 a un nivel detectablemente mayor que un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea.

50 En una realización de la presente invención, dicho dolor es insensible a: (i) terapia esteroidea; (ii) terapia

antiinflamatoria no esteroidea; (iii) terapia opioidea o (iv) terapia opiácea. En otra realización, dichos citoblastos placentarios se formulan para administración por vía local, sistémica, intravenosa o intraarterial.

## 5.1 MÉTODOS DE TRATAMIENTO DEL DOLOR

5 Se describen en la presente memoria métodos de tratamiento del dolor que comprenden la administración de células derivadas de placenta, p. ej. citoblastos placentarios, p. ej., los citoblastos placentarios descritos la sección 5.4 siguiente, o preparados como se describe en el ejemplo 7 siguiente. En el contexto de la presente invención, los citoblastos placentarios usados en los métodos para tratar el dolor descritos en la presente memoria son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otras realizaciones específicas, los citoblastos placentarios usados en los métodos para tratar el dolor descritos en la presente memoria expresan los genes ELOVL2, ST3GAL6, ST6GALNAC5 y/o SLC12A8 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan los genes CPA4, TCF21 y/o VTN a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan los genes B4GALT6, FLJ10781 y/o NUA1 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En una realización específica, dichos citoblastos placentarios expresan además el gen C11orf9 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC.

### 5.1.1 Métodos de tratamiento del dolor

20 El dolor se define en general como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño de tejido real o potencial o se describe en términos de dicho daño. Merskey H, Bogduk N, eds., Classification of Chronic Pain, International Association for the Study of Pain (IASP) Task Force on Taxonomy, IASP Press: Seattle, 209-214, 1994. Debido a que la percepción del dolor es altamente subjetiva, es una de las patologías más difíciles de diagnosticar y tratar eficazmente.

25 En un aspecto, se divulga en la presente memoria un método de tratamiento de un individuo que tiene dolor, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios, o medio de cultivo acondicionado por citoblastos placentarios, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para causar una mejora detectable de dicho dolor o un síntoma asociado a dicho dolor. En un aspecto, dicho método comprende adicionalmente determinar un primer nivel de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichos citoblastos placentarios, y determinar un segundo nivel de dolor en dicho individuo después de la administración de dichos citoblastos placentarios, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios reduce dicho segundo nivel de dicho dolor en comparación con dicho primer nivel de dolor.

En ciertos aspectos, la cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios, cuando se administra, da como resultado una mejora mayor, o más duradera del dolor en el individuo en comparación con la administración de un placebo.

35 En ciertos aspectos, el dolor es dolor nociceptivo. El dolor nociceptivo se desencadena típicamente cuando se liberan estímulos nocivos tales como mediadores químicos de la inflamación después de lesión de tejido, enfermedad o inflamación y se detectan por receptores sensoriales de funcionamiento normal (nociceptores) en el sitio de lesión. Véase, p. ej., Koltzenburg, M. Clin. J. of Pain 16: S131-S138 (2000). Los ejemplos de causas de dolor nociceptivo incluyen, pero sin limitación, quemaduras químicas o térmicas, cortes y contusiones de la piel, artrosis, artritis reumatoide, tendinitis y dolor miofascial. En ciertos aspectos, el dolor nociceptivo se estimula por inflamación.

40 En el contexto de la presente invención, el dolor es dolor neuropático. El dolor neuropático refleja lesión o deterioro del sistema nervioso y se ha definido como "dolor iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción del sistema nervioso". Merskey H, Bogduk N, eds., Classification of Chronic Pain, International Association for the Study of Pain (IASP) Task Force on Taxonomy, IASP Press: Seattle, 209-214, 1994. En una realización específica, el dolor neuropático se caracteriza por una excitabilidad alterada de las neuronas periféricas. En el contexto de la presente invención, el dolor neuropático está causado por neuropatía diabética. En otros aspectos, el dolor neuropático está asociado a neuralgia postherpética, neuralgia del trigémino, inflamación (p. ej., neuroinflamación, neuritis) y/o dolor postapoplejía. En ciertas realizaciones, el dolor neuropático es continuo, episódico y se describe como, p. ej. urente, hormigueante, pruriginoso, fulgurante, de tipo descarga eléctrica, punzante, opresivo, profundo o espasmódico. En ciertas otras realizaciones, el individuo que tiene dolor neuropático experimenta adicionalmente un déficit sensorial parcial o completo, sensaciones desagradables anormales o extrañas (disestesia), dolor resultante de estímulos no nocivos o una percepción desproporcionada del dolor en respuesta a estímulos por encima del umbral (hiperalgesia).

55 En otra realización específica, el dolor neuropático es un síndrome de dolor regional complejo (CRPS). En una realización específica, el CRPS afecta a las extremidades en ausencia de lesión nerviosa (CRPS de tipo I). En una realización más específica, dicho CRPS de tipo I incluye distrofia simpática refleja (RSD). En una realización más específica, dicha RSD es RSD de estadio I, o "RSD temprana". En RSD temprana, el dolor es más grave de lo esperado por la lesión, y tiene una calidad urente o sorda. Puede aumentar dependiendo del miembro, contacto físico o malestar emocional. El área afectada se vuelve típicamente edematosa, puede estar hipertérmica o hipotérmica y puede mostrar

un crecimiento aumentado de uñas y pelo. Las radiografías pueden mostrar cambios óseos tempranos. En otra realización más específica, dicha RSD es RSD de estadio II, o "RSD establecida". En una realización más específica, dicha RSD establecida comprende, además de dolor, induración o tejido edematoso; hiperhidrosis de la piel con livedo reticularis o cianosis; pérdida de cabello; estriación, rotura o fragilización de uñas; desarrollo de manos secas y/o atrofia evidente de la piel y tejidos subcutáneos. El dolor sigue siendo el rasgo dominante. En otra realización más específica, dicha RSD es RSD de estadio III, o "RSD tardía". En una realización más específica, dicha RSD tardía comprende dolor que se extiende proximalmente; daño irreversible de tejido; piel fina y brillante y desmineralización ósea visible en radiografías.

En otro aspecto, el dolor neuropático es dolor causado por un fármaco, p. ej. un fármaco quimioterapéutico o fármaco anticanceroso. En aspectos específicos, el fármaco es o comprende un fármaco que contiene platino, un taxano, una epotilona, un alcaloide vegetal o una talidomida. En realizaciones más específicas, el fármaco es o comprende bortezomib, carboplatino (p. ej., PARAPLATIN®), cisplatino (p. ej., PLATINOL®), citarabina (p. ej., CYTOSAR®, Ara-C), docetaxel (p. ej., TAXOTERE®), etopósido/VP-16 (VEPESID®), gemcitabina (p. ej., GEMZAR®), HALAVEN® (mesilato de eribulina), hexametilmelamina (p. ej., HEXALIN®), paclitaxel (p. ej., TAXOL®; ABRAXANETM), oxaliplatino (p. ej., ELOXATIN®), suramina, talidomida (p. ej., THALOMID®), vinblastina (p. ej., VELBAN®; ALKABAN-AQ®), vincristina (p. ej., ONCOVIN®, VINCASAR PFS®, Vincrex) o vinorelbina (NAVELBINE®).

En ciertos otros aspectos específicos, el fármaco es un antibiótico. En ciertos otros aspectos, el fármaco es una estatina.

En ciertos otros aspectos específicos, el fármaco es o comprende amlodipina (p. ej., NORVASC®, Lotril o Lotrel), atorvastatina (p. ej., LIPITOR®), duloxetina (p. ej., CYMBALTA®), pregabalina (LYRICA®), alopurinol (p. ej., LOPURIM®, ZYLOPRIM®), aminodipinbergato, amiodarona (p. ej., CORDERONE®, PACERONE®), amiodipina, amitriptilina (p. ej., ELAVIL™, ENDEP™, VANATRIP™), metronidazol (p. ej., FLAGYL®, METROGEL™), nitrofurantoina (p. ej., FURADANTIN®, MACROBID®, MACRODANTIN®, NITRO MACRO), perhexilina, VYTORIN®, ciprofloxacina (p. ej., CIPRO®, PROQUIN®), disulfiram (p. ej., ANTABUSE), zolpidem (p. ej., AMBIEN®), buspirona (p. ej., BUSPAR), clonazepam (p. ej., KLONOPIM, CEBERKLON, VALPAX), alprazolam (p. ej., XANAX®), fenitoína (DILANTIN®), citalopram (p. ej., CELEXA), duloxetina (p. ej., CYMBALTA®), venlafaxina (p. ej., EFFEXOR, EFFEXOR XR®), nortriptilina (p. ej., AVENTYL HCL, PAMELOR), sertralina (p. ej., ZOLOFT®), paroxetina (p. ej., PAXIL, PAXIL CR®), atenolol (p. ej., TENORMIN, SENORMIN), perindopril (p. ej., ACEON), altace (p. ej., RAMIPRIL®), losartán (p. ej., COZAAR®, HYZAAR®), hidralazina (p. ej., APRESOLINE®), hidroclorotiazida (p. ej., HYDRODIURIL™, EZIDE™, HYDRO-PAR™, MICROZIDE™), lisinopril (p. ej., PRINOVIL®, ZESTRIL®), telmisartán (p. ej., MICARDIS™), perhexilina, prazosina (p. ej., MINIPRESS®), lisinopril (p. ej., PRINIVIL®, ZESTRIL®), lovastatina (p. ej., ALTOCOR®, MEVACOR®), CADUET®, rosuvastatina (p. ej., CRESTOR®), fluvastatina (p. ej., LESCOL®, LESCOL® XL), simvastatina (p. ej., ZOCOR®), cerivastatina (p. ej., LIPOBAY™), gemfibrozil (p. ej., LOPID®), pravastatina (p. ej., PRAVACHOL®, PRAVIGARD PAC™), d4T (estavudina, p. ej. ZERIT®), ddC (zalcitibina; p. ej., HIVID®), ddl (didanosina, p. ej., VIDEX® EC), isoniazida (p. ej., TUBIZID®) o diaminodifenilsulfona (DDS, dapsona).

En ciertas realizaciones, el dolor neuropático no es dolor causado por un fármaco, p. ej., un fármaco quimioterapéutico o fármaco anticanceroso. En realizaciones específicas, el dolor neuropático no es dolor causado por un fármaco que contiene platino, un taxano, una epotilona, un alcaloide vegetal o una talidomida. En realizaciones más específicas, el dolor neuropático no es dolor causado por bortezomib, carboplatino (p. ej., PARAPLATIN®), cisplatino (p. ej., PLATINOL®), citarabina (p. ej., CYTOSAR®, Ara-C), docetaxel (p. ej., TAXOTERE®), etopósido/VP-16 (VEPESID®), gemcitabina (p. ej., GEMZAR®), HALAVEN® (mesilato de eribulina), hexametilmelamina (p. ej., HEXALIN®), paclitaxel (p. ej., TAXOL®; ABRAXANE™), oxaliplatino (p. ej., ELOXATIN®), suramina, talidomida (p. ej., THALOMID®), vinblastina (p. ej., VELBAN®; ALKABAN-AQ®), vincristina (p. ej., ONCOVIN®, VINCASAR PFS®, Vincrex) o vinorelbina (NAVELBINE®).

En otra realización específica, dicho CRPS afecta a las extremidades en presencia de una lesión nerviosa (CRPS de tipo II). En una realización más específica, dicho CRPS II incluye causalgia. En otra realización específica, dicho CRPS incluye síndrome de dolor de mantenimiento simpático. En ciertas realizaciones, los síntomas de CRPS incluyen, pero sin limitación, dolor, disfunción autónoma, edema, trastorno del movimiento, distrofia, atrofia, dolor urente y alodinia (dolor ante un contacto leve). En ciertas realizaciones, el dolor relacionado con CRPS está acompañado por hinchamiento y dolor articular con la palpación, sudoración aumentada, sensibilidad a la temperatura y/o cambio de color de la piel.

En ciertos otros aspectos específicos, el dolor neuropático es dolor neuropático causado por o relacionado con una deficiencia dietética. En un aspecto más específico, la deficiencia dietética es deficiencia de vitamina B12 (cobalamina, cianocobalamina). En otro aspecto más específico, la deficiencia dietética es deficiencia de vitamina B6 (piridoxina, fosfato de piridoxal). En otro aspecto más específico, la deficiencia dietética es deficiencia de vitamina B1 (tiamina). En otro aspecto específico, el individuo que tiene dolor neuropático causado por deficiencia nutricional ha experimentado cirugía bariátrica. En otro aspecto específico, el dolor neuropático está causado por o relacionado con alcoholismo o consumo de alcohol por el individuo que tiene dolor.

En ciertos aspectos, el dolor está causado por o asociado a vulvodinia. La vulvodinia es dolor de la vulva, p. ej. dolor no explicado por infección vulvar o vaginal o enfermedad cutánea. En un aspecto, el dolor de vulvodinia se localiza en

5 la región vulvar, p. ej., en la región vestibular tal como vestibulitis vulvar o vestibulodinia. En otro aspecto, el dolor de vulvodinia puede extenderse al clítoris, p. ej., clitorodinia. Los ejemplos de causas de vulvodinia incluyen, pero sin limitación, dispareunia, lesión o irritación de los nervios que inervan la vulva, predisposición genética a la inflamación, alergia, trastornos autoinmunitarios (p. ej., lupus eritematoso o síndrome de Sjogren), infección (p. ej., infecciones por levadura, HPV o vaginosis bacteriana) y neuropatía. Los síntomas ejemplares de vulvodinia incluyen, sin limitación, dolor difuso o sensación urente en o alrededor de la vulva, los labios mayores, labios menores o vestíbulo.

10 En ciertos aspectos, el dolor está causado por o asociado con cistitis intersticial. La cistitis intersticial, también conocida como síndrome de dolor de vejiga, es una afección crónica caracterizada a menudo, p. ej., por dolor o presión asociados a la vejiga, dolor asociado a la micción, vaciado irritativo, frecuencia o urgencia urinaria o dolor o presión en la pelvis. La patología y patogénesis de la cistitis intersticial no se entienden claramente. Sin embargo, se han propuesto varias causas posibles, p. ej., obstrucción vascular, autoinmunidad, inflamación, revestimiento de vejiga con filtraciones, mastocitos, estrés y causas genéticas, neurogénicas y endocrinas. En un aspecto, puede hacerse el diagnóstico de cistitis intersticial, p. ej., por la encuesta de paciente de dolor pélvico y urgencia/frecuencia urinaria (PUF) o la prueba KCl, también conocida como prueba de sensibilidad al potasio.

15 En ciertos otros aspectos, el dolor es dolor visceral.

En ciertos otros aspectos, el dolor es dolor posoperatorio, tal como el resultante de traumatismo en tejido causado durante cirugía.

En ciertos otros aspectos, el dolor es dolor mixto, p. ej. es dolor crónico que tiene componentes nociceptivos y neuropáticos. En aspectos específicos, dicho dolor mixto es dolor de cáncer o dolor lumbar.

20 En ciertos otros aspectos, el dolor es dolor de migraña o dolor de cefalea, p. ej. cefalea vascular, cefalea en brotes o cefalea tóxica.

25 En realizaciones específicas, dichos síntomas asociados al dolor incluyen, pero sin limitación, uno o más de disfunción autónoma, incapacidad de iniciar el movimiento, debilidad, temblor, espasmo muscular, distonía, distrofia, atrofia, edema, rigidez, dolor articular con la palpación, sudoración aumentada, sensibilidad a temperatura o roce ligero (alodinia), cambio de color de la piel, hipertermia o hipotermia, crecimiento aumentado de uñas y cabello, cambios óseos tempranos, hiperhidrosis con livedo reticularis o cianosis, pérdida de cabello, uñas estriadas, rotas o quebradizas, manos secas, osteoporosis difusa, daño irreversible de tejido, piel fina y brillante, contracturas articulares y desmineralización ósea notable.

30 En ciertas realizaciones, la administración de citoblastos placentarios a un individuo de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria da como resultado la reducción del dolor en el individuo sin el efecto secundario acompañante que está asociado a uno o más fármacos indicados/usados para el tratamiento del dolor, p. ej. gabapentina. En una realización específica, el uso de citoblastos placentarios de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria da como resultado la reducción del dolor en un individuo al que se administran los citoblastos placentarios, pero no da como resultado una deficiencia de coordinación sensorial y/o motora en dicho individuo.

35 **5.1.2 Escalas de valoración del dolor**

40 En una realización, la cantidad eficaz de citoblastos placentarios administrada al individuo que tiene dolor es una cantidad que da como resultado una reducción detectable del dolor en el individuo. La reducción puede ser detectable por el individuo, detectable por un observador o ambos. En ciertas realizaciones de los métodos de tratamiento proporcionados en la presente memoria, se valora el nivel de dolor en el individuo por el individuo, p. ej. guiado por un facultativo, o como parte de un procesamiento pretratamiento, según una o más escalas de dolor individuales. En ciertas otras realizaciones, se valora el nivel de dolor en el individuo por un observador usando una o más escalas de dolor del observador. Cuando se valoran los niveles de dolor según el método antes y después de la administración de citoblastos placentarios, se usa la misma escala preferiblemente para cada valoración. El dolor en el individuo puede valorarse una vez o más, p. ej. 2, 3, 4 o 5 veces, antes de la administración de citoblastos placentarios, y una vez o más, p. ej., 2, 3, 4 o 5 veces, después de la administración de citoblastos placentarios.

50 En una realización, se valora el dolor en el individuo por la escala numérica 0-10 de intensidad del dolor. En esta escala, cero es igual a ningún dolor y 10 es igual al peor dolor. En ciertas realizaciones, p. ej. la escala de valoración de la calidad del dolor, el dolor se descompone en más de un descriptor numérico, p. ej., 0-10 para lo "caliente" que se siente el dolor, 0-10 para lo "intenso" que se siente el dolor, 0-10 para lo "agudo" que se siente el dolor, 0-10 para lo "sordo" que se siente el dolor, 0-10 para lo "frío" que se tiene el dolor, 0-10 para lo "sensible" que se siente el dolor, 0-10 para lo "dolorido a la palpación" que se siente el dolor, 0-10 para lo "irritante" que se siente el dolor, 0-10 para lo "fulgurante" que se siente el dolor, 0-10 para lo "entumecido" que se siente el dolor, 0-10 para lo "hormigueante" que se siente el dolor, 0-10 para lo "eléctrico" que se siente el dolor, 0-10 para lo "acalambado" que se siente el dolor, 0-10 para lo "palpitante" que se siente el dolor, 0-10 para lo "radiante" que se siente el dolor, 0-10 para lo "constante" que se siente el dolor, 0-10 para lo "intenso" que se siente el dolor y/o 0-10 para lo "desagradable" que se siente el dolor.

En otra realización, se valora el dolor del individuo mediante la escala de intensidad de dolor descriptiva simple. En esta escala, el dolor se describe, p. ej., como “sin dolor”, “dolor leve”, “dolor moderado”, “dolor fuerte”, “dolor muy fuerte” o “el peor dolor posible”.

5 En otra realización, se valora el dolor del individuo mediante la escala analógica visual. En la escala analógica visual, se presenta al individuo un gráfico consistente en una línea vertical; un extremo de la línea se etiqueta “sin dolor” y el otro extremo se etiqueta “el peor dolor posible”. Se pide al individuo que marque en la línea un punto entre los dos extremos que indique el nivel de dolor percibido por el individuo.

10 En otra realización, se valora el dolor del individuo mediante la escala de calificación del dolor FACES de Wong-Baker. En la escala de calificación del dolor FACES, se indica el nivel de dolor por una serie de caras dibujadas, típicamente seis caras, que parecen de felices a progresivamente más infelices. En una realización específica, las caras se subtítulan con frases tales como “sin dolor”, “duele un poco”, “duele un poco más”, “duele todavía más”, “duele mucho” y “duele muchísimo”. En otra realización específica, las caras se subtítulan con frases tales como “sin dolor”, “dolor leve molesto”, “dolor persistente incómodo y problemático”, “dolor angustioso y deprimente”, “dolor intenso, espantoso y horrible” y “el dolor peor posible, insoportable y atroz”, solas o acompañadas por una escala numérica de 0 a 10.

15 En ciertas realizaciones, se valora el dolor del individuo mediante la escala FLACC (cara, piernas, actividad, lloro y consolabilidad). En realizaciones específicas, se califica cada una de las cinco características, p. ej., de 0 a 2, indicando 2 dolor e indicando 0 sin dolor. Las puntuaciones pueden usarse separadamente o totalizarse.

20 En ciertas otras realizaciones, se valora el dolor del individuo mediante la escala CRIES (lloro, requiere O<sub>2</sub> para SaO<sub>2</sub> (saturación de hemoglobina), signos vitales aumentados (presión sanguínea y ritmo cardíaco, expresión e insomnio). En realizaciones específicas, se califican cada una de las cinco características, p. ej. de 0 a 2, indicando 2 dolor e indicando 0 sin dolor. Las puntuaciones pueden usarse separadamente o totalizarse.

25 En ciertas realizaciones, se valora el dolor del individuo mediante la escala COMFORT, que valora nueve características diferentes (vigilancia, calma, dificultades respiratorias, lloro, movimiento físico, tono muscular, tensión facial, presión sanguínea y ritmo cardíaco), clasificada cada una en una escala de 1-5, indicando 1 sin dolor o menor y 5 el mayor dolor. Las puntuaciones pueden usarse individualmente o totalizarse.

### 5.1.3 Indicios fisiológicos del dolor

30 Como se usa en la presente memoria “tratamiento del dolor” y similares pueden comprender eliminar completamente el dolor; una reducción perceptible del dolor por el individuo que padece el dolor; una reducción detectable del dolor o indicios de dolor por criterios objetivos (p. ej., ritmo cardíaco, presión sanguínea, tono muscular o similares) o una combinación de dos cualesquiera o los tres. En ciertas otras realizaciones, puede valorarse el dolor en el individuo, antes o después de la administración de citoblastos placentarios, o ambos, por criterios fisiológicos, p. ej. criterios fisiológicos de estrés. Tales criterios fisiológicos pueden incluir criterios medibles objetivamente tales como ritmo cardíaco o presión sanguínea, p. ej. ritmo cardíaco o presión sanguínea elevados en comparación con un estado sin dolor del individuo, o en comparación con la norma esperada (p. ej., presión sistólica de 120 y diastólica de 80; 60 pulsaciones por minuto). Tales criterios fisiológicos pueden incluir también, o en lugar de ello, criterios medibles subjetivamente tales como expresiones faciales, tensión muscular (tono muscular), sudoración, temblores y similares.

40 Por tanto, en ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios administrada al individuo que tiene dolor da como resultado una reducción detectable del ritmo cardíaco en el individuo, p. ej. una reducción de un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 %; una reducción del ritmo cardíaco de 120 pulsaciones por minuto (ppm) o por encima a por debajo de 110 ppm; una reducción de 110 ppm o por encima a por debajo de 100 ppm; una reducción de 100 ppm o por encima a por debajo de 90 ppm; una reducción de 90 ppm o por encima a por debajo de 80 ppm; una reducción de 120 ppm o por encima a por debajo de 100 ppm; una reducción de por encima a por debajo de 90 ppm; una reducción de por encima de 100 ppm a por debajo de 80 ppm; una reducción de por encima de 130 ppm a por debajo de 100 ppm; una reducción de por encima de 120 ppm a por debajo de 90 ppm; una reducción de por encima de 110 ppm a por debajo de 80 ppm o un reducción de 120 ppm o por encima a por debajo de 80 ppm.

50 En ciertas otras realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios, cuando se administra al individuo que tiene dolor, da como resultado una reducción detectable de la presión sanguínea en el individuo, p. ej. una reducción de un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % de la presión sistólica, diastólica o ambas del individuo; una reducción de la presión sistólica de individuo de 200 o por encima a por debajo de 190; una reducción de la presión sistólica de 190 o por encima a por debajo de 180; una reducción de la presión sistólica de 180 o por encima a por debajo de 170; una reducción de la presión sistólica de 170 o por encima a por debajo de 160; una reducción de la presión sistólica de 160 o por encima a por debajo de 150; una reducción de la presión sistólica de 150 o por encima a por debajo de 140; una reducción de la presión sistólica de 140 o por encima a por debajo de 130; una reducción de la presión sistólica de 200 o por encima a por debajo de 180; una reducción de la presión sistólica de 190 o por encima a por debajo de 170; una reducción de la presión sistólica de 180 o por encima a por debajo de 160; una reducción de la presión sistólica de 170 o por encima a por debajo de 150; una reducción de la presión sistólica de 160 o por encima a por debajo de 140; una reducción de la presión sistólica de 150 o por encima

5 a por debajo de 130; una reducción de la presión sistólica de 200 o por encima a por debajo de 170; una reducción de la presión sistólica de 190 o por encima a por debajo de 160; una reducción de la presión sistólica de 180 o por encima a por debajo de 150; una reducción de la presión sistólica de 170 o por encima a por debajo de 140; una reducción de la presión sistólica de 160 o por encima a por debajo de 130; una reducción de la presión sistólica de 200 o por encima a por debajo de 160; una reducción de la presión sistólica de 190 o por encima a por debajo de 150; una reducción de la presión sistólica de 180 o por encima a por debajo de 140; una reducción de la presión sistólica de 200 o por encima a por debajo de 130; una reducción de la presión sistólica de 200 o por encima a por debajo de 150; una reducción de la presión sistólica de 190 o por encima a por debajo de 140; una reducción de la presión sistólica de 180 o por encima a por debajo de 130; una reducción de la presión sistólica de 200 o por encima a por debajo de 140; una reducción de la presión sistólica de 190 o por encima a por debajo de 130; o una reducción de la presión sistólica de 200 o por encima a por debajo de 130; una reducción de la presión diastólica del individuo de 140 o por encima a por debajo de 130; una reducción de la presión diastólica de 130 o por encima a por debajo de 120; una reducción de la presión diastólica de 120 o por encima a por debajo de 110; una reducción de la presión diastólica de 110 o por encima a por debajo de 100; una reducción de la presión diastólica de 100 o por encima a por debajo de 90; una reducción de la presión diastólica de 140 o por encima a por debajo de 120; una reducción de la presión diastólica de 110 o por encima a por debajo de 90; una reducción de la presión diastólica de 140 o por encima a por debajo de 110; una reducción de la presión diastólica de 130 o por encima a por debajo de 100; una reducción de la presión diastólica de 120 o por encima a por debajo de 90; una reducción de la presión diastólica de 140 o por encima a por debajo de 100; una reducción de la presión diastólica de 130 o por encima a por debajo de 90; o una reducción de la presión diastólica de 140 o por encima a por debajo de 90.

25 En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios, cuando se administra a un individuo que tiene dolor, da como resultado una reducción detectable de la cantidad de una o más citocinas (p. ej., citocinas proinflamatorias) en el individuo. En una realización específica, la administración de citoblastos placentarios a un individuo que tiene dolor de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria da como resultado una disminución de la cantidad de IL-2, IL-6, IL-12, IL-17 y/o interferón- $\gamma$ , o cualquier combinación de las mismas, en el individuo. La valoración de las disminuciones de citocinas en el individuo puede lograrse usando cualquier método conocido en la materia, p. ej. los niveles de citocinas en el plasma sanguíneo del individuo pueden medirse usando, p. ej., ELISA.

30 En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios, cuando se administra al individuo que tiene dolor, da como resultado un aumento detectable de una o más citocinas en el individuo. En una realización específica, la administración de citoblastos placentarios a un individuo que tiene dolor de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria da como resultado un aumento de la cantidad de IL-10 en el individuo. La valoración de los aumentos de los niveles de citocina en el individuo puede lograrse usando cualquier método conocido en la materia, p. ej. los niveles de citocina en el plasma sanguíneo del individuo pueden medirse usando, p. ej., ELISA.

35 En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios, cuando se administra al individuo que tiene dolor, da como resultado una reducción detectable de la cantidad de una o más quimiocinas en el individuo. En una realización específica, la administración de citoblastos placentarios a un individuo que tiene dolor de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria da como resultado una disminución de la cantidad de CCL2, CCL12 y/o CXCL1, o cualquier combinación de las mismas, en el individuo. La valoración de quimiocinas en el individuo puede lograrse usando cualquier método conocido en la materia, p. ej., los niveles de quimiocina en el plasma sanguíneo del individuo pueden medirse usando, p. ej., ELISA.

45 En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de citoblastos placentarios, cuando se administra al individuo que tiene dolor, da como resultado una reducción detectable de la activación y/o diferenciación en uno o más tipos celulares del individuo. En una realización específica, la administración de citoblastos placentarios a un individuo que tiene dolor de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria da como resultado una disminución de la activación y/o diferenciación de células dendríticas, linfocitos T y/o macrófagos, o cualquier combinación de los mismos, en el individuo. La valoración de la activación y/o diferenciación de tipos celulares específicos en el individuo puede lograrse usando cualquier método conocido en la materia, p. ej., la medida de marcadores celulares específicos presentes en áreas específicas del individuo, p. ej., la medida/valoración de marcadores celulares específicos asociados a células de la sangre, o asociados a células encontradas en tejidos/órganos específicos.

## 5.2 SUPRESIÓN DE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A, O CAUSANTE DE, DOLOR

55 La inflamación no es la única fuente de dolor. Sin embargo, en ciertos aspectos, pueden usarse citoblastos placentarios para mejorar el dolor relacionado con, o causado por, inflamación. En un aspecto, se divulga en la presente memoria un método para la mejora del dolor en un individuo que comprende poner en contacto una célula o células inmunitarias del individuo con una cantidad eficaz de citoblastos placentarios, en el que dicha cantidad eficaz es una cantidad que (1) suprime detectablemente una respuesta inmunitaria en dicho individuo y (2) reduce detectablemente el dolor en dicho individuo. En aspectos específicos, dichos citoblastos placentarios suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR) o un ensayo de regresión. La puesta en contacto puede lograrse, p. ej., administrando los citoblastos placentarios al individuo, p. ej., por vía local, sistémica o regional (o por una combinación de las mismas). Por tanto, se divulga en la presente memoria un método para la mejora del

dolor en un individuo que comprende poner en contacto una célula o células inmunitarias del individuo con una cantidad eficaz de citoblastos placentarios, en el que dicha cantidad eficaz es una cantidad que (1) modula detectablemente, p. ej. suprime, una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria en dicho individuo, y (2) reduce detectablemente el dolor en dicho individuo. En un aspecto específico, poner en contacto la célula o células inmunitarias del individuo con una cantidad eficaz de citoblastos placentarios da como resultado una disminución de la cantidad de IL-2, IL-6, IL-12, IL-17 y/o interferón  $\gamma$ , o cualquier combinación de las mismas, en el individuo. En otro aspecto específico, la puesta en contacto de una célula o células inmunitarias del individuo con una cantidad eficaz de citoblastos placentarios da como resultado una disminución de la cantidad de CCL2, CCL12 y/o CXCL1, o cualquier combinación de las mismas, en el individuo. En otro aspecto específico, poner en contacto la célula o células inmunitarias del individuo con una cantidad eficaz de citoblastos placentarios da como resultado un aumento de la cantidad de IL-10 en el individuo.

En otro aspecto, se divulga en la presente memoria un método para la mejora del dolor en un individuo que comprende administrar una cantidad eficaz de citoblastos placentarios al individuo, en el que dicha cantidad eficaz es una cantidad que (1) modula detectablemente, p. ej., suprime, una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria en dicho individuo y (2) reduce detectablemente el dolor en dicho individuo. En aspectos específicos, dichos citoblastos placentarios suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR) o un ensayo de regresión. La administración puede efectuarse por vía local, sistémica o regional (o por una combinación de las mismas). En un aspecto específico, la administración de una cantidad eficaz de citoblastos placentarios al individuo da como resultado una disminución de la cantidad de IL-2, IL-6, IL-12, IL-17 y/o interferón  $\gamma$ , o cualquier combinación de los mismos, en el individuo. En otro aspecto específico, administrar una cantidad eficaz de citoblastos placentarios al individuo da como resultado una disminución de la cantidad de CCL2, CCL12 y/o CXCL1, o cualquier combinación de los mismos, en el individuo. En otro aspecto específico, administrar una cantidad eficaz de citoblastos placentarios al individuo da como resultado un aumento de la cantidad de IL-10 en el individuo.

Una "célula inmunitaria" en el contexto de este método significa cualquier célula del sistema inmunitario (adaptativo o innato), particularmente linfocitos T y linfocitos NK (citolíticos naturales), células dendríticas y macrófagos. Por tanto en diversos aspectos del método, se ponen en contacto los citoblastos placentarios con una pluralidad de células inmunitarias, en el que la pluralidad de células inmunitarias son, o comprenden, una pluralidad de linfocitos T (p. ej. una pluralidad de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o linfocitos T CD8<sup>+</sup>) y/o linfocitos citolíticos naturales. Una "respuesta inmunitaria" en el contexto del método puede ser cualquier respuesta de una célula inmunitaria a un estímulo percibido normalmente por una célula inmunitaria, p. ej. una respuesta a la presencia de un antígeno. En diversos aspectos, una respuesta inmunitaria puede ser la proliferación de linfocitos T (p. ej., linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o linfocitos CD8<sup>+</sup>) en respuesta a un antígeno extraño, tal como un antígeno presente en una transfusión o injerto, o a un autoantígeno como en una enfermedad autoinmunitaria. La respuesta inmunitaria puede ser también la proliferación de linfocitos T contenidos en un injerto. La respuesta inmunitaria puede ser también cualquier actividad de un linfocito citolítico natural (NK), la maduración de una célula dendrítica, la diferenciación de linfocitos T, sesgar macrófagos al linaje M1 o M2 o similares.

Los citoblastos placentarios usados para la reducción o mejora del dolor, p. ej., por reducción de la inflamación, pueden derivar también de una sola especie, p. ej., la especie del receptor pretendido o la especie de las células inmunitarias cuya función se ha de reducir o suprimir, o pueden derivar de múltiples especies.

En diversos aspectos, dicha puesta en contacto es suficiente para suprimir una función inmunitaria (p. ej. proliferación de linfocitos T en respuesta a un antígeno) o inflamación en un individuo aquejado de dolor en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %, en comparación con la función inmunitaria en ausencia de los citoblastos placentarios. Tal supresión en un contexto *in vivo* puede determinarse en un ensayo *in vitro* (véase a continuación) usando, p. ej., una muestra de linfocitos T del individuo, es decir, el grado de supresión en el ensayo *in vitro* puede extrapolarse, para un número particular de citoblastos placentarios y un número de células inmunitarias en un individuo receptor, al grado de supresión en el individuo.

Pueden ensayarse los citoblastos placentarios, p. ej., en un MLR que comprende combinar linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, células dendríticas (DC) y citoblastos placentarios a una relación de aproximadamente 10:1:2, en el que los linfocitos T se tiñen con un tinte tal como, p. ej., CFSE que se reparte en células hijas, y en el que los linfocitos T se permiten proliferar durante aproximadamente 6 días. Los linfocitos T y/o células DC puede obtenerse del individuo para tratar, p. ej., pueden ser autólogos del individuo, o pueden ser alogénicos del individuo. Los citoblastos placentarios son inmunosupresores si la proliferación de linfocitos T a los 6 días en presencia de citoblastos placentarios se reduce detectablemente en comparación con la proliferación de linfocitos T en presencia de DC y ausencia de citoblastos placentarios. En un aspecto de un MLR, por ejemplo, los citoblastos placentarios pueden descongelarse o recolectarse de cultivo. Se resuspenden aproximadamente 20.000 citoblastos placentarios en 100  $\mu$ l de medio (RPMI 1640, tampón HEPES 1 mM, antibióticos y suero humano combinado al 5 %) y se permiten adherir al fondo de un pocillo durante 2 horas. Se aíslan los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> T de perlas magnéticas Miltenyi con células mononucleares de sangre periférica completa. Se tiñen las células con CFSE y se añaden un total de 100.000 linfocitos T (linfocitos T CD4<sup>+</sup> solos, linfocitos T CD8<sup>+</sup> solos o iguales cantidades de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) por pocillo. Se lleva el volumen en el pocillo a 200  $\mu$ l y se permite proceder el MLR.

En ciertos aspectos, se determina la actividad antiinflamatoria (concretamente, la actividad inmunosupresora) de los

citoblastos placentarios antes de la administración al individuo que padece dolor. Esto puede lograrse, por ejemplo, determinando la actividad inmunosupresora de una muestra de los citoblastos placentarios para administrar para la mejora del dolor. Tal actividad puede determinarse, por ejemplo, ensayando una muestra de los citoblastos placentarios o citoblastos placentarios en, p. ej., un MLR o ensayo de regresión. En un aspecto, se efectúa un MLR con la muestra y se determina el grado de inmunosupresión demostrado por los citoblastos placentarios de la muestra en el ensayo. Se espera que el grado de mejora del dolor se correlacione con la actividad inmunosupresora de los citoblastos placentarios muestreados. Por tanto, el MLR puede usarse como método para determinar la capacidad absoluta y relativa de una población particular de citoblastos placentarios o citoblastos placentarios de mejorar el dolor atribuible a inflamación.

Los parámetros de MLR pueden variarse para proporcionar más datos o para determinar mejor la capacidad de una muestra de citoblastos placentarios o citoblastos placentarios de inmunosuprimir y, por lo tanto mejorar el dolor. Por ejemplo, debido a que la inmunosupresión por citoblastos placentarios parece aumentar más o menos en proporción al número de citoblastos placentarios presentes en el ensayo, puede efectuarse el MLR, en una realización, con dos o más números de citoblastos placentarios, p. ej.,  $1 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y/o  $3 \times 10^4$  citoblastos placentarios por reacción. El número de citoblastos placentarios respecto al número de linfocitos T en el ensayo puede variarse también. Por ejemplo, los citoblastos placentarios y linfocitos T en el ensayo pueden estar presentes a cualquier relación de, p. ej., aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferiblemente de aproximadamente 1:5, aunque puede usarse un número relativamente mayor de citoblastos placentarios o linfocitos T.

El ensayo de regresión o ensayo de BTR puede usarse de forma similar.

Pueden administrarse citoblastos placentarios a un individuo a una relación, con respecto a un número conocido o esperado de células inmunitarias, p. ej., linfocitos T, en el individuo de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferiblemente de aproximadamente 1:5. Sin embargo, pueden administrarse los citoblastos placentarios a un individuo a una relación, en ejemplos no limitantes, de aproximadamente 10.000: 1, aproximadamente 1.000:1, aproximadamente 100: 1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:1.000 o aproximadamente 1:10.000. En general, pueden administrarse aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  citoblastos placentarios por kilogramo de receptor, preferiblemente aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  citoblastos placentarios por kilogramo de receptor para efectuar la inmunosupresión. En diversos aspectos, los citoblastos placentarios administrados a un individuo o sujeto comprenden, al menos, aproximadamente o no más de  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$  citoblastos placentarios o más.

Los citoblastos pueden administrarse también con uno o más segundos tipos de citoblastos, p. ej., citoblastos mesenquimatosos de médula ósea. Tales segundos citoblastos pueden administrarse a un individuo con dichos citoblastos placentarios a una relación de, p. ej., entre aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1.

Para facilitar la puesta en contacto, o la proximidad de citoblastos placentarios y células inmunitarias *in vivo*, pueden administrarse los citoblastos placentarios a un individuo por cualquier vía suficiente para poner en contacto los citoblastos placentarios y células inmunitarias entre sí. Por ejemplo, pueden administrarse los citoblastos placentarios al individuo, p. ej., por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, parenteral, intratecal, subcutánea o directamente en un órgano, p. ej., páncreas. Los citoblastos placentarios pueden administrarse a un área de un individuo que padece dolor en el sitio de dolor, o en un sitio de daño nervioso que causa dolor. Para administración *in vivo*, los citoblastos placentarios pueden formularse como una composición farmacéutica, como se describe en la sección 5.8.1.2 siguiente.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios administrados al individuo que padece dolor se han genomanipulado para expresar una o más citocinas antiinflamatorias. En una realización específica, dichas citocinas antiinflamatorias comprenden IL-10.

### 45 **5.3 SEGUNDAS COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS Y SEGUNDAS TERAPIAS**

En cualquiera de los métodos anteriores de tratamiento del dolor en un individuo, el método puede comprender la administración de una segunda composición terapéutica o segunda terapia, p. ej., una medicación o terapia antidolor. En una realización preferida, los segundos agentes activos son capaces de mitigar el dolor, inhibir o modular reacciones inflamatorias, proporcionar un efecto sedante o un efecto antineurálgico o asegurar la comodidad del paciente.

En ciertas realizaciones, las segundas composiciones terapéuticas comprenden, pero sin limitación, analgésicos opioides, analgésicos no narcóticos, antiinflamatorios, inhibidores de cox-2, agonistas o antagonistas de receptor alfa-adrenérgico, ketamina, agentes anestésicos, antagonistas de NMDA, agentes inmunomoduladores, agentes inmunosupresores, antidepresivos, anticonvulsivos, antihipertensivos, ansiolíticos, bloqueantes de canal de calcio, relajantes musculares, corticosteroides, oxígeno hiperbárico, inhibidores de JNK, otros productos terapéuticos conocidos por mitigar el dolor y sales, solvatos, hidratos, esteroisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables y metabolitos farmacológicamente activos de los mismos.

5 En ciertas realizaciones, la segunda composición terapéutica es un opioide. Los opioides pueden usarse, p. ej., para tratar dolor fuerte. Los ejemplos de analgésicos opioides incluyen, pero sin limitación, oxycodona (p. ej., OXYCONTIN®), sulfato de morfina (p. ej., MS CONTIN®, DURAMORPH®, y/o ASTRAMORPH®), meperidina (p. ej., DEMEROL®) y parche transdérmico de fentanilo (p. ej., DURAGESIC®) y otras medicaciones convencionales conocidas. La oxycodona (p. ej., OXYCONTIN®) es una forma de larga acción de un opioide y puede usarse, p. ej., en los estadios inicial y tardío de CRPS.

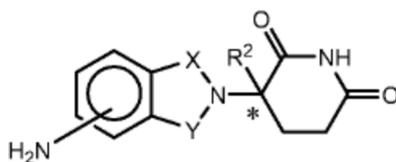
10 Pueden usarse analgésicos y antiinflamatorios no narcóticos, p. ej., para el tratamiento del dolor durante el embarazo y lactancia. Pueden usarse fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), p. ej., en el estadio temprano del síndrome de dolor. Los ejemplos de antiinflamatorios incluyen, pero sin limitación, acetato de ácido salicílico (p. ej., aspirina), ibuprofeno (p. ej., MOTRIN®, ADVIL®, o similares), ketoprofeno (p. ej., ORUVAIL®), rofecoxib (p. ej., VIOXX®), naproxeno de sodio (p. ej., ANAPROX®, NAPRELAN®, NAPROSYN® o similares), ketorolaco (p. ej., ACULAR®), u otras medicaciones convencionales conocidas. Es un inhibidor de COX-2 específico celecoxib (p. ej., CELEBREX).

15 Los ejemplos de segundos compuestos terapéuticos que son antidepresivos incluyen, pero sin limitación, nortriptilina (PAMELOR®), amitriptilina (ELAVIL®), imipramina (TOFRANIL®), doxepina (SINEQUAN®), clomipramina (ANAFRANIL®), fluoxetina (PROZAC®), sertralina (ZOLOFT®), nefazodona (SERZONE®), venlafaxina (EFFEXOR®), trazodona (DESYREL®), bupropión (WELLBUTRIN®) y otras medicaciones convencionales conocidas. Véase, p. ej., Physicians' Desk Reference, 329, 1417, 1831 y 3270 (57ª ed., 2003).

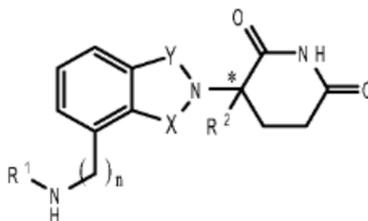
20 Los ejemplos de segundos compuestos terapéuticos que son fármacos anticonvulsivos incluyen, pero sin limitación, carbamazepina, oxcarbazepina, gabapentina (NEURONTIN®), feniloína, valproato de sodio, clonazepam, topiramato, lamotrigina, zonisamida y tiagabina. Véase, p. ej., Physicians' Desk Reference, 2563 (57ª ed., 2003).

25 Otros segundos compuestos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, corticosteroides (p. ej., prednisona, dexametasona o hidrocortisona), agentes antiarrítmicos de clase Ib oralmente activos (p. ej., mexiletina), bloqueantes de canal de calcio (p. ej., nifedipina), beta-bloqueantes (p. ej., propranolol), alfa-bloqueantes (p. ej., fenoxibenzamina) y pueden usarse también agonistas alfa2-adrenérgicos (p. ej., clonidina) en combinación con un compuesto inmunomodulador. Véase, p. ej., Physicians' Desk Reference, 1979, 2006 y 2190 (57ª ed., 2003).

30 En otra realización específica, dicha segunda terapia comprende un compuesto inmunomodulador, en la que el compuesto inmunomodulador es 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona; 3-(4'-aminoisolidolin-1'-ona)-1-piperidin-2,6-diona; 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona o una  $\alpha$ -(3-aminofalimid)glutarimida. En una realización más específica, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



35 en la que uno de x e Y es C=O, el otro de x e Y es C=O o CH<sub>2</sub>, y R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo inferior, o una sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiómero o diastereómero, racemato farmacéuticamente aceptable o mezcla de estereoisómeros de los mismos. En otra realización más específica, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



en la que uno de x e Y es C=O y el otro es CH<sub>2</sub> o C=O;

40 R<sup>1</sup> es H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo, alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarilo-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), C(O)R<sup>3</sup>, C(S)R<sup>3</sup>, C(O)OR<sup>4</sup>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-OR<sup>5</sup>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-C(O)OR<sup>5</sup>, C(O)NHR<sup>3</sup>, C(S)NHR<sup>3</sup>, C(O)NR<sup>3</sup>R<sup>3</sup>, C(S)NR<sup>3</sup>R<sup>3</sup> o alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-O(CO)R<sup>5</sup>;

R<sup>2</sup> es H, F, bencilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) o alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>3</sup> y R<sup>3'</sup> son independientemente alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo, alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarilo (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>)-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-OR<sup>5</sup>, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-C(O)OR<sup>5</sup>, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-O(CO)R<sup>5</sup> o C(O)OR<sup>5</sup>;

5 R<sup>4</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-OR<sup>5</sup>, bencilo, arilo, alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), o alquil (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarilo (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>);

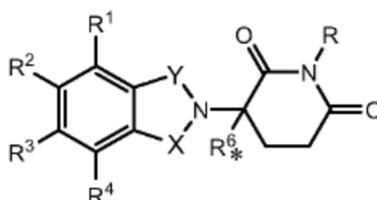
R<sup>5</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo o heteroarilo (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>);

cada aparición de R<sup>6</sup> es independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo, heteroarilo (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) o alquilo (C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>)-C(O)O-R<sup>5</sup> o los grupos R<sup>6</sup> pueden unirse formando un grupo heterocicloalquilo;

n es 0 o 1; y

10 \* representa un centro quiral de carbono;

o una sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiómero, diastereómero o racemato farmacéuticamente aceptable o mezcla de estereoisómeros de los mismos. En otra realización más específica, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



15 en la que:

uno de x e Y es C=O y el otro es CH<sub>2</sub> o C=O;

R es H o CH<sub>2</sub>OCOR';

20 (i) cada uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup>, independientemente de los demás, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, o (ii) uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> es nitro o -NHR<sup>5</sup> y los R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> restantes son hidrógeno;

R<sup>5</sup> es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 carbonos

R<sup>6</sup> es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro o fluorα;

R' es R<sup>7</sup>-CHR<sup>10</sup>-N(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>);

R<sup>7</sup> es m-fenileno o p-fenileno o -(C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)- en que n tiene un valor de 0 a 4;

25 cada uno de R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> tomados independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> tomados conjuntamente son tetrametileno, pentametileno, hexametileno o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- en que X<sub>1</sub> es -O-, -S- o -NH-;

R<sup>10</sup> es hidrógeno, alquilo de a 8 átomos de carbono o fenilo; y

\* representa un centro quiral de carbono;

30 o una sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiómero, diastereómero o racemato farmacéuticamente aceptable o estereoisómeros de los mismos. En realizaciones específicas, el segundo compuesto terapéutico es lenalidomida o pomalidomida.

Puede administrarse cualquier combinación de los agentes terapéuticos anteriores. Tales agentes terapéuticos pueden administrarse en cualquier combinación con los citoblastos placentarios, al mismo tiempo o en un curso de tratamiento separado.

35 Debería señalarse que algunos de los segundos compuestos terapéuticos enumerados anteriormente (p. ej., fluoxetina), aunque tienen un efecto beneficioso, pueden causar por sí mismos como efecto secundario dolor neuropático en un pequeño número de receptores. En general, tales compuestos se consideran seguros para administrar, sin embargo, un especialista en la materia (p. ej. un médico) será capaz de determinar el beneficio relativo de administrar tal segundo compuesto terapéutico en comparación con el riesgo de dolor neuropático adicional.

Los citoblastos placentarios pueden administrarse al individuo que padece dolor en forma de una composición farmacéutica, p. ej., una composición farmacéutica adecuada para inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal. Los citoblastos placentarios pueden administrarse al individuo en una sola dosis o en múltiples dosis. Cuando se administran los citoblastos placentarios en múltiples dosis, las dosis pueden ser parte de un régimen terapéutico diseñado para mitigar el dolor, o pueden ser parte de un régimen terapéutico a largo plazo diseñado para tratar la causa subyacente del dolor. En realizaciones en que se administran citoblastos placentarios con un segundo agente terapéutico, o con un segundo tipo de citoblastos, los citoblastos placentarios y segundo agente terapéutico y/o segundo tipo de citoblastos pueden administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes, p. ej., las administraciones pueden tener lugar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 minutos entre sí, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22 horas entre sí, o a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días o más entre sí.

#### 5.4 CITOBLASTOS PLACENTARIOS Y POBLACIONES DE CITOBLASTOS PLACENTARIOS

Los métodos de tratamiento de un individuo que tiene dolor, o de mejora del dolor en un individuo, proporcionados en la presente memoria comprenden administrar citoblastos placentarios al individuo que padece dolor. En ciertas realizaciones, los citoblastos placentarios tienen también, en números suficientes, la capacidad de suprimir detectablemente una función inmunitaria, p. ej., la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos o ensayo de regresión.

Los citoblastos placentarios pueden ser de origen fetal o materno (es decir, pueden tener el genotipo de cualquiera de madre o feto). Las poblaciones de citoblastos placentarios, o poblaciones de células que comprenden citoblastos placentarios, pueden comprender citoblastos placentarios que son únicamente de origen fetal o materno, o pueden comprender una población mixta de citoblastos placentarios de origen tanto fetal como materno. Los citoblastos placentarios, y poblaciones de células que comprenden los citoblastos placentarios, pueden identificarse y seleccionarse por el marcador morfológico y las características de cultivo comentadas a continuación.

##### 5.4.1 Características físicas y morfológicas

Los citoblastos placentarios usados como se describe en la presente memoria, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato de cultivo de tejido, p. ej., superficie de recipiente de cultivo de tejido (p. ej., plástico de cultivo de tejido). Los citoblastos placentarios en cultivo asumen una apariencia en general fibroblastoide estrellada, con una serie de procesos citoplasmáticos que se extienden desde el cuerpo celular central. Los citoblastos placentarios son, sin embargo, morfológicamente diferenciables de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que los citoblastos placentarios exhiben un mayor número de tales procesos que los fibroblastos. Morfológicamente, los citoblastos placentarios son también diferenciables de los citoblastos hematopoyéticos, que asumen en general una morfología en cultivo más redonda o de guijarro.

##### 5.4.2 Marcadores de superficie celular, moleculares y genéticos

Los citoblastos placentarios aislados, p. ej., citoblastos placentarios multipotentes aislados y poblaciones de tales citoblastos placentarios aislados, útiles en los métodos divulgados en la presente memoria, p. ej. los métodos de tratamiento del dolor, son citoblastos placentarios humanos adherentes a plástico de cultivo de tejido que tienen características de células multipotentes o citoblastos, y expresan una pluralidad de marcadores que pueden usarse para identificar y/o aislar las células o poblaciones de células que comprenden los citoblastos. Los citoblastos placentarios aislados y poblaciones de células placentarias (p. ej., dos o más citoblastos placentarios aislados) descritos en la presente memoria incluyen citoblastos placentarios y poblaciones celulares que contienen células placentarias obtenidas directamente de la placenta, o cualquier parte de la misma (p. ej. corion, cotiledones placentarios o similares). Las poblaciones de células placentarias aisladas incluyen también poblaciones (es decir, dos o más) de citoblastos placentarios aislados en cultivo, y una población en un recipiente, p. ej., una bolsa. Los citoblastos placentarios aislados descritos en la presente memoria no son células mesenquimatosas derivadas de médula ósea, citoblastos mesenquimatosos derivados de tejido adiposo ni células mesenquimatosas obtenidas de sangre de cordón umbilical, sangre placentaria o sangre periférica. Las células placentarias, p. ej., células multipotentes placentarias y citoblastos placentarios, útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, se describen en la presente memoria y, p. ej., en las patentes de EE. UU. n° 7.311.904; 7.311.905 y 7.468.276; y en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n° 2007/0275362.

En ciertos aspectos, los citoblastos placentarios aislados son CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> como se detectan por citometría de flujo. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> tienen el potencial de diferenciarse en células de fenotipo neural, células de fenotipo osteogénico y/o células de fenotipo condrogénico. En el contexto de la presente invención, los citoblastos placentarios aislados CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> son adicionalmente CD200<sup>+</sup>, concretamente los citoblastos placentarios son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, los citoblastos placentarios aislados CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> CD200<sup>+</sup> son adicionalmente CD45<sup>-</sup> o CD90<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>, como se detecta por citometría de flujo. En otra realización específica, los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD90<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>, como se detecta por citometría de flujo. En otra realización específica, los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD90<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>, como se detecta por citometría de flujo, concretamente las células son CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>

y CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> son adicionalmente CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>. En ciertas realizaciones específicas de cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, los citoblastos placentarios son adicionalmente OCT-4<sup>+</sup>.

5 Los citoblastos placentarios aislados en general no expresan alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA). Los citoblastos placentarios aislados expresan en general moléculas de MHC de clase I, p. ej., HLA-A,B,C.

10 En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios son CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>, y uno o más de CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, MHC de clase II<sup>-</sup> (p. ej., HLA-DR,DP,DQ<sup>-</sup>), SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-A,B,C<sup>+</sup>, PDL1<sup>+</sup>, ABC-p<sup>+</sup> y/o OCT-4<sup>+</sup>, como se detecta por citometría de flujo. En otras realizaciones, cualquiera de los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> descritos anteriormente son adicionalmente uno o más de CD29<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> o SH4<sup>+</sup>. En otra realización específica, los citoblastos placentarios son adicionalmente CD44<sup>+</sup>. En otra realización específica de cualquiera de los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados anteriores, las células son adicionalmente uno o más de CD117<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup> o ligando de muerte programada 1 (PDL1)<sup>+</sup> o cualquier combinación de los mismos.

15 En otra realización, los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> son adicionalmente uno o más de CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD144/VE-caderina<sup>baño</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup> o ligando de muerte programada 1 (PDL1)<sup>+</sup>, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> son adicionalmente CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD144/VE-caderina<sup>baño</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup> y ligando de muerte programada 1 (PDL1)<sup>+</sup>.

20 En otra realización específica, cualquiera de los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria son adicionalmente ABC-p<sup>+</sup>, como se detecta por citometría de flujo u OCT-4<sup>+</sup> (POU5F1<sup>+</sup>), como se determina por reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), en los que ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP) o como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)), y OCT-4 es la proteína octamérica 4 (POU5F1). En otra realización específica, cualquiera de los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria son adicionalmente SSEA3<sup>-</sup> o SSEA4<sup>-</sup>, como se determina por citometría de flujo, en los que SSEA3 es antígeno embrionario 3 específico de estadio y SSEA4 es antígeno embrionario 4 específico de estadio. En otra realización específica, cualquiera de los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria son adicionalmente SSEA3<sup>-</sup> y SSEA4<sup>-</sup>.

25 En otra realización específica, cualquiera de los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria son, o son adicionalmente, uno o más de MHC-I<sup>+</sup> (p. ej., HLA-A,B,C<sup>+</sup>), MHC-II<sup>-</sup> (p. ej., HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>) o HLA-G<sup>-</sup>. En otra realización específica, cualquiera de los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria son adicionalmente MHC-I<sup>+</sup> (p. ej., HLA-A,B,C<sup>+</sup>), MHC-II<sup>-</sup> (p. ej., HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>) y HLA-G<sup>-</sup>.

30 Se proporcionan también en la presente memoria poblaciones de citoblastos placentarios aislados, o poblaciones de células, p. ej. poblaciones de células placentarias que comprenden, p. ej. que están enriquecidas en, citoblastos placentarios aislados, que son útiles en los métodos y composiciones divulgados en la presente memoria. Las poblaciones preferidas de células son aquellas que comprenden los citoblastos placentarios aislados, en las que las poblaciones de células comprenden, p. ej., al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup> aislados; es decir, al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de las células de dicha población son citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup> aislados. En el contexto de la presente invención, los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En otra realización específica, los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD90<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>, como se detecta por citometría de flujo. En otra realización específica, los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD90<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>, como se detecta por citometría de flujo. En otra realización específica, cualquiera de los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados descritos anteriormente son adicionalmente uno o más de CD29<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> o SH4<sup>+</sup>. En otra realización específica, los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD44<sup>+</sup>. En una realización específica de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados anteriores, los citoblastos placentarios aislados son adicionalmente uno o más de CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD144/VE-caderina<sup>baño</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup> o ligando de muerte programada 1 (PDL1)<sup>+</sup> o cualquier combinación de los mismos. En otra realización específica, los citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> son adicionalmente CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD144/VE-caderina<sup>baño</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>,

SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>-</sup> y ligando de muerte programada 1 (PDL1)<sup>+</sup>.

En ciertos aspectos, los citoblastos placentarios aislados en dicha población de células son uno o más, o todos, de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y ABC-p<sup>+</sup>, en los que dichos citoblastos placentarios aislados se obtienen por disgregación física y/o enzimática de tejido placentario. En un aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup> y ABC-p<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>, en los que dichos citoblastos placentarios aislados tienen al menos una de las siguientes características: CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> y SSEA4<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> y SSEA4<sup>-</sup>. En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> y SSEA4<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>, y son SH2<sup>+</sup> o SH3<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> y SH3<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> y SSEA4<sup>-</sup>, y son SH2<sup>+</sup> o SH3<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>, y cualquiera de SH2<sup>+</sup> o SH3<sup>+</sup>, y son al menos uno de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> o SSEA4<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> y SSEA4<sup>-</sup>, y son cualquiera de SH2<sup>+</sup> o SH3<sup>+</sup>.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup> o SSEA4<sup>-</sup>. En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> y SSEA4<sup>-</sup>. En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> y SSEA4<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> o CD45<sup>-</sup>.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos y composiciones divulgados en la presente memoria son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> y SH4<sup>+</sup>; en los que dichos citoblastos placentarios aislados son adicionalmente uno o más de OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> o SSEA4<sup>-</sup>.

En ciertos aspectos, los citoblastos placentarios aislados son CD200<sup>+</sup> o HLA-G<sup>-</sup>. En un aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son CD200<sup>+</sup> y HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son adicionalmente CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son adicionalmente CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son adicionalmente CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados CD200<sup>+</sup> o HLA-G<sup>-</sup> facilitan la formación de cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende los citoblastos placentarios aislados, en condiciones que permitan la formación de los cuerpos de tipo embrioide. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados se aíslan de células placentarias que no son dichos citoblastos placentarios. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados se aíslan de células placentarias que no manifiestan esta combinación de marcadores.

En otro aspecto, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, p. ej. que está enriquecida en, citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>. En un aspecto específico, dicha población es una población de células placentarias. En diversos aspectos, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 % o al menos aproximadamente un 60 % de las células en dicha población celular son citoblastos placentarios aislados CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>. Preferiblemente, al menos aproximadamente un 70 % de las células en dicha población celular son citoblastos placentarios aislados CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>. Más preferiblemente, al menos un 90 %, 95 % o 99 % de dichas células son citoblastos placentarios aislados CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>. En un aspecto específico de las poblaciones celulares, dichos citoblastos placentarios aislados CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> son también CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> son también CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> son también CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto, dicha población celular produce uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otro aspecto específico, dicha población celular se aísla de células placentarias que no son citoblastos placentarios. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> se aíslan de células placentarias que no manifiestan estos marcadores.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende los citoblastos placentarios aislados, cuando la población se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados se aíslan de células placentarias que no son los citoblastos placentarios aislados. En otro aspecto específico, los

citoblastos placentarios aislados se aíslan de células placentarias que no manifiestan estos marcadores.

En otro aspecto, una población celular útil en los métodos y composiciones descrito en la presente memoria es una población de células que comprende, p. ej. que está enriquecida en, citoblastos placentarios aislados CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. En diversos aspectos, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 % o al menos aproximadamente un 60 % de las células en dicha población celular son citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados. En otro aspecto, al menos aproximadamente un 70 % de dichas células en dicha población de células son citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados. En otro aspecto, al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células en dicha población de células son citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> aislados. En un aspecto específico de dichas poblaciones, los citoblastos placentarios aislados son HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha población de células produce uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otro aspecto específico, dicha población de citoblastos placentarios se aísla de células placentarias que no son citoblastos placentarios. En otro aspecto específico, dicha población de citoblastos placentarios se aísla de células placentarias que no manifiestan estas características.

En ciertos otros aspectos, los citoblastos placentarios aislados son uno o más de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> o ABC-p<sup>+</sup>. En un aspecto específico, los citoblastos placentarios humanos aislados son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> y SH4<sup>+</sup>. En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup> y ABC-p<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup> y SSEA4<sup>-</sup>. En un aspecto específico, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup> y SSEA4<sup>-</sup> aislados son adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> y SH4<sup>+</sup>. En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup>, y cualquiera de SH3<sup>+</sup> o SH4<sup>+</sup>. En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son CD34<sup>-</sup> y cualquiera de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> u OCT-4<sup>+</sup>.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En un aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados son HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados facilitan la producción de uno o más cuerpos de tipo embrioide por una población de células placentarias que comprende los citoblastos placentarios, cuando la población se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados se aíslan de células placentarias que no son dichos citoblastos placentarios. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados se aíslan de células placentarias que no manifiestan estas características.

En otro aspecto, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, p. ej. que está enriquecida en, citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>. En diversos aspectos, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 % o al menos aproximadamente un 60 % de las células en dicha población celular son citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados. En otro aspecto, al menos aproximadamente un 70 % de dichas células son dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados. En otro aspecto, al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células de dicha población celular son dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados. En un aspecto específico de las poblaciones aisladas, dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, la población celular produce uno o más cuerpos de tipo embrioide en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide. En otro aspecto específico, dicha población celular se aísla de células placentarias que no son citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> aislados. En otro aspecto específico, dicha población celular se aísla de células placentarias que no manifiestan estos marcadores.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-

G<sup>-</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados son adicionalmente OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados facilitan la formación de cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende dichos citoblastos placentarios, cuando la población se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embriode. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados se aíslan de células placentarias que no son los citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados. En otro aspecto, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados se aíslan de células placentarias que no manifiestan estos marcadores.

En otro aspecto, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, p. ej. que está enriquecida en, citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>-</sup> aislados. En diversos aspectos, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 % o al menos aproximadamente un 60 % de las células de dicha población de células son citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados. En otro aspecto, al menos aproximadamente un 70 % de las células de dicha población de células son citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados. En otro aspecto, al menos aproximadamente un 90 %, 95 % o 99 % de las células de dicha población de células son citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados. En un aspecto específico de las poblaciones anteriores, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados son adicionalmente OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha población celular se aísla de células placentarias que no son citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha población celular se aísla de células placentarias que no manifiestan estos marcadores.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de citoblastos placentarios aislados que comprende dichas células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> cuando dicha población se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embriode. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados se aíslan de células placentarias que no son dichas células. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados se aíslan de células placentarias que no manifiestan estas características.

En otro aspecto, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, p. ej. que está enriquecida en, citoblastos placentarios aislados que son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias aisladas que comprende dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embriode. En diversos aspectos, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 % o al menos aproximadamente un 60 % de las células de dicha población de células son dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados. En otro aspecto, al menos aproximadamente un 70 % de las células de dicha población de células son dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados. En otro aspecto, al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células de dicha población de células son dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados. En un aspecto específico de las poblaciones anteriores, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha población celular se aísla de células placentarias que no son dichos citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> aislados. En otro aspecto específico, dicha población celular se aísla de células placentarias que no manifiestan estos marcadores.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son OCT-4<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias aisladas que comprende dichos citoblastos placentarios cuando dicha población de células se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embriode. En un aspecto específico dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En

otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados se aíslan de células placentarias que no son células placentarias OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados se aíslan de células placentarias que no manifiestan estas características.

En otro aspecto, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, p. ej. que está enriquecida en, citoblastos placentarios aislados que son OCT-4<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en un población de citoblastos placentarios aislados que comprende dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide. En diversos aspectos, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 % o al menos aproximadamente un 60 % de las células de dicha población de células son citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados. En otro aspecto, al menos aproximadamente un 70 % de las células de dicha población de células son dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados. En otro aspecto, al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células de dicha población de células son dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados. En un aspecto específico de las poblaciones anteriores, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios OCT-4<sup>+</sup> aislados son adicionalmente CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha población celular se aísla de células placentarias que no son dichos citoblastos placentarios. En otro aspecto específico, dicha población celular se aísla de células placentarias que no manifiestan estos marcadores.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son citoblastos placentarios HLA-A,B,C<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y CD34<sup>-</sup> aislados. En otro aspecto, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende citoblastos placentarios aislados, en la que al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % de las células de dicha población de células son citoblastos placentarios HLA-A,B,C<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y CD34<sup>-</sup> aislados. En un aspecto específico, dicha célula placentaria aislada o población de células placentarias aisladas se aísla de células placentarias que no son citoblastos placentarios HLA-A,B,C<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y CD34<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados no son de origen materno. En otro aspecto específico, dicha población de citoblastos placentarios aislados está sustancialmente libre de componentes maternos; p. ej. al menos aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichas células en dicha población de citoblastos placentarios aislados son de origen no materno.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup> aislados. En otro aspecto, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprenden citoblastos placentarios aislados en la que al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % de células en dicha población de células son citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup> aislados. En un aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados o población de citoblastos placentarios aislados se aísla de células placentarias que no son dichos citoblastos placentarios aislados. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup> aislados son de origen no materno, concretamente tienen el genotipo fetal. En otro aspecto específico, al menos aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 80 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichas células en dicha población de citoblastos placentarios aislados son de origen no materno. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados o población de citoblastos placentarios aislados se aíslan de células placentarias que no manifiestan estas características.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son células placentarias CD10<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, y CD117<sup>-</sup>. En otro aspecto, una población celular útil para los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, p. ej. enriquecida en, células placentarias aisladas, en la que al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % de las células de dicha población de células son células placentarias CD10<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD117<sup>-</sup> aisladas. En un aspecto específico, dichas células placentarias aisladas o población de células placentarias aisladas se aíslan de células placentarias que no son dichas células. En otro aspecto específico, dichas células placentarias aisladas son de origen no materno. En otro aspecto preferido, al menos aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichos citoblastos placentarios de dicha población celular son de origen no materno. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados o población de citoblastos placentarios aislados se aíslan de células placentarias que no manifiestan estos marcadores.

5 En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD117<sup>-</sup> aislados. En otro aspecto, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una población de células que comprende, p. ej. enriquecida en, citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD117<sup>-</sup> aislados, en la que al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % de las células de dicha población son citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD117<sup>-</sup>. En un aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados o población de citoblastos placentarios aislados se aíslan de células placentarias que no son dichos citoblastos placentarios. En otro aspecto específico, dichas células placentarias aisladas son de origen no materno. En otro aspecto específico, al menos aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichas células en dicha población celular son de origen no materno. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados o población de citoblastos placentarios aislados se aíslan de células placentarias que no manifiestan estas características.

15 En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son HLA-A,B,C<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup> y son adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y/o HLA-G<sup>-</sup>, y/o negativos de CD117. En otro aspecto, una población celular útil en los métodos descritos en la presente memoria es una población de células que comprenden citoblastos placentarios aislados, en la que al menos aproximadamente un 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o aproximadamente un 99 % de las células de dicha población son citoblastos placentarios aislados que son HLA-A,B,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y que son adicionalmente positivos de CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 y/o negativos de CD117 y/o HLA-G. En un aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados o población de citoblastos placentarios aislados se aíslan de células placentarias que no son dichos citoblastos placentarios. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados son de origen no materno. En otro aspecto específico, al menos aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichos citoblastos placentarios en dicha población celular son de origen no materno. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados o población de citoblastos placentarios aislados se aíslan de células placentarias que no manifiestan estas características.

30 En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son citoblastos placentarios aislados que son CD200<sup>+</sup> y CD10<sup>+</sup>, como se determina por unión de anticuerpos, y CD117<sup>-</sup>, como se determina tanto por unión de anticuerpos como RT-PCR. En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son citoblastos placentarios aislados que son CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, MHC de clase I<sup>+</sup> y β-2-microglobulina<sup>+</sup>. En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son citoblastos placentarios en los que la expresión de al menos un marcador celular es al menos dos veces mayor que en un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos, p. ej. citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea. En otro aspecto específico, dichos citoblastos placentarios aislados son de origen no materno. En otro aspecto específico, al menos aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de dichas células en dicha población celular son de origen no materno.

40 En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados son citoblastos placentarios aislados que son uno o más de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD104<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD144/VE-caderina<sup>bajo</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, β-2-microglobulina<sup>bajo</sup>, MHC-I<sup>bajo</sup>, MHC-II<sup>-</sup>, HLA\_G<sup>bajo</sup> y/o PDL1<sup>bajo</sup>. En un aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son al menos CD29<sup>+</sup> y CD54<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son al menos CD44<sup>+</sup> y CD106<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, los citoblastos placentarios aislados son al menos CD29<sup>+</sup>.

45 En otro aspecto, una población celular útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria comprende citoblastos placentarios aislados, y al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células de dicha población celular son citoblastos placentarios aislados que son uno o más de citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62-E<sup>-</sup>, CD62-L<sup>-</sup>, CD62-P<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD104<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD144/VE-caderina<sup>opaco</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, β-2-microglobulina<sup>opaco</sup>, HLA\_I<sup>opaco</sup>, HLA-II<sup>-</sup>, HLA\_G<sup>opaco</sup> y/o PDL1<sup>opaco</sup>. En otro aspecto específico, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células de dicha población son citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62-E<sup>-</sup>, CD62-L<sup>-</sup>, CD62-P<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD104<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD144/VE-caderina<sup>opaco</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, β-2-microglobulina<sup>opaco</sup>, MHC\_I<sup>opaco</sup>, MHC-II<sup>-</sup>, HLA\_G<sup>opaco</sup> y PDL1<sup>opaco</sup>. En ciertos aspectos, los citoblastos placentarios expresan marcadores HLA-II cuando se inducen por interferón gamma (IFN-γ).

55 En otro aspecto, los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son citoblastos placentarios aislados que son uno o más, de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>+</sup>, SSEA4<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y ABC-p<sup>+</sup>, donde ABC-p es una proteína transportadora ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia a cáncer de mama (BRCP) o como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)), en los que dichos citoblastos placentarios aislados se obtienen por perfusión de placenta de un mamífero, p. ej., humano, que se ha drenado de sangre de cordón y perfundido para retirar la sangre residual.

60

En otro aspecto específico de cualquiera de las realizaciones anteriores, se determina la expresión del marcador o marcadores celulares indicados (p. ej., agrupamiento de diferenciación o marcador o marcadores inmunogénicos) por citometría de flujo. En otro aspecto específico, se determina la expresión del marcador o marcadores por RT-PCR.

5 El análisis de perfil génico confirma que los citoblastos placentarios aislados, y poblaciones de citoblastos placentarios aislados, son distinguibles de otras células, p. ej., citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea. Los citoblastos placentarios aislados descritos en la presente memoria pueden distinguirse, p. ej., de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea basándose en la expresión de uno o más genes cuya expresión es significativamente mayor en los citoblastos placentarios aislados en comparación con los citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea. En particular, los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos de tratamiento  
10 proporcionados en la presente memoria pueden distinguirse de los citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea basándose en la expresión de uno o más genes cuya expresión es significativamente mayor (es decir, al menos dos veces mayor) en los citoblastos placentarios aislados que en un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea, en los que el uno o más genes son ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A o una combinación de cualquiera de los anteriores, cuando las células crecen en condiciones equivalentes. Véase, p. ej., la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007/0275362. En ciertos aspectos  
15 específicos, dicha expresión de dicho uno o más genes se determina, p. ej., por RT-PCR o análisis de micromatrices, p. ej., usando una micromatriz U133-A (Affymetrix).

En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios aislados expresan dicho uno o más genes cuando se cultivan durante una serie de duplicaciones de población, p. ej., cualquiera de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 duplicaciones de población, en un medio que comprende DMEM-LG (p. ej., de Gibco); 2 % de suero fetal de ternero (p. ej., de Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-seroalbúmina bovina (LA-BSA);  
25 dexametasona  $10^{-9}$  M (p. ej., de Sigma); 2-fosfato de ácido ascórbico  $10^{-4}$  M (p. ej., de Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (p. ej., de R&D Systems) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (p. ej., de R&D Systems). En otro aspecto específico, el gen específico de célula placentaria aislada es CD200.

Pueden encontrarse secuencias específicas para estos genes en GenBank en los números de acceso NM\_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), NM\_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM\_001845 (COL4A1), NM\_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758 (DMD), AF293359 (DSC3), NM\_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM\_018215 (FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM\_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (IL1A), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NM\_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM\_014476 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160 o BC065328 (SLC12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN) y BC005001 (ZC3H12A) a marzo de 2008.

En ciertos aspectos específicos, dichos citoblastos placentarios aislados expresan cada uno de ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A a un nivel detectablemente mayor que un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea, cuando las células crecen en condiciones equivalentes.

En una realización específica, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan el gen ELOVL2 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea (BM-MSC). En otra realización específica, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan el gen ST3GAL6 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En otra realización específica, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan el gen ST6GALNAC5 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En otra realización específica, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan el gen SLC12A8 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios expresan el gen ARTS-1, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 o TGFB2 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios expresan todos, o expresan una combinación de cualquiera de los genes ARTS-1, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 y TGFB2 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dichos genes por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, al menos un 70 % de dichos citoblastos placentarios son de origen no materno.

60 En una realización específica, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria

- expresan todos, o una combinación de cualquiera, de los genes ELOVL2, ST3GAL6, ST6GALNAC5 y SLC12A8 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios expresan el gen ARTS-1, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 o TGFB2 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios expresan todos, o expresan una combinación de cualquiera, de los genes ARTS-1, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, y TGFB2 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dichos genes por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, al menos un 70 % de dichos citoblastos placentarios son de origen no materno.
- En ciertas realizaciones, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan el gen CPA4, TCF21 o VTN a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En una realización específica, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan todos, o expresan una combinación, de cualquiera de los genes CPA4, TCF21 y VTN a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, al menos un 70 % de dichos citoblastos placentarios son de origen no materno.
- En ciertas realizaciones, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan el gen B4GALT6, FLJ10781 o NUAK1 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En una realización específica, dichos citoblastos placentarios expresan además el gen C11orf9 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, al menos un 70 % de dichos citoblastos placentarios son de origen no materno.
- En una realización específica, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan todos, o expresan una combinación, de cualquiera de los genes B4GALT6, FLJ10781 y NUAK1 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios expresan además el gen C11orf9 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En una realización específica, los citoblastos placentarios usados en los métodos descritos en la presente memoria expresan todos, o expresan una combinación, de cualquiera de los genes B4GALT6, FLJ10781, NUAK1 y C11orf9 a un nivel detectablemente mayor que la expresión de dicho gen por un número equivalente de BM-MSC. En ciertas realizaciones dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, al menos un 70 % de dichos citoblastos placentarios son de origen no materno.
- En aspectos específicos, los citoblastos placentarios expresan CD200 y ARTS1 (regulador de aminopeptidasa del factor de necrosis tumoral de tipo 1); ARTS-1 y LRAP (aminopeptidasa de arginina derivada de leucocitos); IL6 (interleucina 6) y TGFB2 (factor de crecimiento transformante beta 2); IL6 y KRT18 (queratina 18); IER3 (respuesta inmediata temprana 3), MEST (homólogo de transcrito específico de mesodermo) y TGFB2; CD200 e IER3; CD200 e IL6; CD200 y KRT18; CD200 y LRAP; CD200 y MEST; CD200 y NFE2L3 (factor nuclear (derivado de eritroide 2) de tipo 3) o CD200 y TGFB2 a un nivel detectablemente mayor que un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea, en los que dichos citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea han experimentado una serie de pases en cultivo equivalentes al número de pases que han experimentado dichos citoblastos placentarios aislados. En otros aspectos específicos, los citoblastos placentarios expresan ARTS-1, CD200, IL6 y LRAP; ARTS-1, IL6, TGFB2, IER3, KRT18 y MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 y TGFB2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 y TGFB2; o IER3, MEST y TGFB2 a un nivel detectablemente mayor que un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea, en los que dichos citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea han experimentado una serie de pases en cultivo equivalente al número de pases que han experimentado dichos citoblastos placentarios aislados.
- La expresión de los genes anteriormente referenciados puede valorarse por técnicas estándares. Por ejemplo, pueden seleccionarse individualmente sondas basadas en la secuencia del gen o genes y construirse mediante técnicas convencionales. La expresión de los genes puede valorarse, p. ej., en una micromatriz que comprende sondas de uno o más de los genes, p. ej., una matriz Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133A 2.0 o Affymetrix GENECHIP® Human Genome U133 Plus 2.0 (Santa Clara, California). La expresión de estos genes puede valorarse incluso si la secuencia de un número de acceso a GenBank particular está corregida debido a que pueden generarse fácilmente sondas específicas de la secuencia corregida usando técnicas estándares bien conocidas.
- El nivel de expresión de estos genes puede usarse para confirmar la identidad de una población de citoblastos placentarios aislados, para identificar una población de células que comprenden al menos una pluralidad de citoblastos placentarios aislados o similares. Las poblaciones de citoblastos placentarios aislados cuya identidad se confirma pueden ser clonales, p. ej., poblaciones de citoblastos placentarios aislados expandidas a partir de un solo citoblasto placentario aislado, o una población mixta de citoblastos placentarios, p. ej., una población de células que comprenden citoblastos placentarios aislados que se expanden a partir de múltiples citoblastos placentarios aislados, o una población de células que comprende citoblastos placentarios aislados como se describe en la presente memoria, y al

menos otro tipo de célula.

El nivel de expresión de estos genes puede usarse para seleccionar poblaciones de citoblastos placentarios aislados. Por ejemplo, puede seleccionarse una población de células, p. ej., citoblastos placentarios expandidos clonalmente, si la expresión de uno o más de los genes enumerados anteriormente es significativamente mayor en una muestra de la población de células que en una población equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea. Tal selección puede ser de una población de una pluralidad de poblaciones de citoblastos placentarios aislados, de una pluralidad de poblaciones celulares cuya identidad no es conocida, etc.

Los citoblastos placentarios aislados pueden seleccionarse basándose en el nivel de expresión de uno o más de tales genes en comparación con el nivel de expresión de dicho uno o más genes en, p. ej., un control de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea. En una realización, el nivel de expresión de dicho uno o más genes en una muestra que comprende un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea se usa como control. En otra realización, el control para citoblastos placentarios aislados ensayados en ciertas condiciones es un valor numérico que representa el nivel de expresión de dicho uno o más genes en citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea en dichas condiciones.

Los citoblastos placentarios aislados descritos en la presente memoria manifiestan las características anteriores (p. ej., combinaciones de marcadores de superficie celular y/o perfiles de expresión génica) en cultivo primario o durante la proliferación en medio que comprende, p. ej., DMEM-LG (Gibco), 2 % de suero fetal de ternero (FCS) (Hyclone Laboratories), 1x insulina-transferrina-selenio (ITS), 1x ácido linoleico-seroalbúmina bovina (LA-BSA), dexametasona  $10^{-9}$  M (Sigma), 2-fosfato de ácido ascórbico  $10^{-4}$  M (Sigma), factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml (R&D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFB) 10 ng/ml (R&D Systems) y 100 U de penicilina/1000 U de estreptomina.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los citoblastos placentarios divulgados en la presente memoria, las células son humanas. En ciertas realizaciones de cualquiera de las células placentarias divulgadas en la presente memoria, las características de marcador celular o características de expresión génica son marcadores humanos o genes humanos.

En otra realización específica de los citoblastos placentarios aislados o poblaciones de células que comprenden los citoblastos placentarios aislados, dichas células o población se han expandido, por ejemplo sometido a pasajes al menos aproximadamente, o no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces, o han proliferado durante al menos aproximadamente, o no más de 1, 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 de población. En otra realización específica de dichos citoblastos placentarios aislados o poblaciones de células que comprenden los citoblastos placentarios aislados, dichas células o población son principalmente aislamientos. En otra realización específica de los citoblastos placentarios aislados, o población de células que comprenden los citoblastos placentarios aislados que se divulgan en la presente memoria, dichos citoblastos placentarios aislados son de origen fetal (es decir, tienen el genotipo fetal).

En ciertas realizaciones, dichos citoblastos placentarios aislados no se diferencian durante el cultivo en medio de crecimiento, concretamente medio formulado para promover la proliferación, p. ej. durante la proliferación en medio de crecimiento. En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios aislados no requieren una capa de alimentación para proliferar. En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios aislados no se diferencian en cultivo en ausencia de una capa de alimentación, únicamente debido a la falta de una capa celular de alimentación.

En otra realización, las células placentarias aisladas son positivas de aldehído deshidrogenasa (ALDH), como se valora por un ensayo de actividad aldehído deshidrogenasa. Tales ensayos son conocidos en la materia (véase, p. ej., Bostian y Betts, *Biochem. J.*, 173, 787, (1978)). En una realización específica, dicho ensayo de ALDH usa ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregón) como marcador de la actividad aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, entre aproximadamente un 3 % y aproximadamente un 25 % de los citoblastos placentarios son positivos de ALDH. En otra realización, dichos citoblastos placentarios aislados muestran una actividad ALDH al menos tres veces o al menos cinco veces mayor que una población de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea que tiene aproximadamente el mismo número de células y se cultivan en las mismas condiciones.

En ciertas realizaciones de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden los citoblastos placentarios aislados descritos en la presente memoria, los citoblastos placentarios en dichas poblaciones de células están sustancialmente libres de células que tienen un genotipo materno; p. ej., al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de los citoblastos placentarios en dicha población tienen un genotipo fetal. En ciertas otras realizaciones de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden los citoblastos placentarios aislados descritos en la presente memoria, las poblaciones de células que comprenden dichos citoblastos placentarios están sustancialmente libres de células que tienen un genotipo materno; p. ej., al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células de dicha población tienen un genotipo fetal.

En una realización específica de cualquiera de los citoblastos placentarios aislados o poblaciones celulares que comprenden los citoblastos placentarios aislados anteriores, el cariotipo de las células, p. ej., todas las células o al

menos aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 % de las células de dicha población, es normal. En otra realización específica de cualquiera de los citoblastos placentarios o poblaciones de citoblastos placentarios anteriores, los citoblastos placentarios son de origen no materno.

5 En una realización específica de cualquiera de las realizaciones de células placentarias divulgadas en la presente memoria, las células placentarias son genéticamente estables, manifestando un recuento cromosómico diploide normal y un cariotipo normal.

10 Los citoblastos placentarios aislados, o poblaciones de citoblastos placentarios aislados, que portan cualquiera de las combinaciones anteriores de marcadores, pueden combinarse en cualquier relación. Pueden combinarse dos cualesquiera o más de las poblaciones de citoblastos placentarios aislados anteriores para formar una población de citoblastos placentarios aislados. Por ejemplo, una población de citoblastos placentarios aislados puede comprender una primera población de citoblastos placentarios aislados definida por una de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente, y una segunda población de citoblastos placentarios aislados definida por otra de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente, en la que dichas primera y segunda poblaciones se combinan a una relación de aproximadamente 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2 o aproximadamente 99:1. De forma similar, pueden combinarse tres, cuatro, cinco o más cualesquiera de los citoblastos placentarios aislados o poblaciones de citoblastos placentarios aislados anteriormente descritos.

20 Los citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden obtenerse, p. ej., por disgregación de tejido placentario, con o sin digestión enzimática (véase la sección 5.3.3) o perfusión (véase la sección 5.3.4). Por ejemplo, pueden producirse poblaciones de citoblastos placentarios aislados según un método que comprende perfundir una placenta de mamífero que se ha drenado de sangre de cordón y perfundido para retirar la sangre residual; perfundir dicha placenta con una solución de perfusión y recoger dicha solución de perfusión, en el que dicha solución de perfusión después de perfusión comprende una población de células placentarias que comprende citoblastos placentarios aislados; y aislar dichos citoblastos placentarios aislados de dicha población de células. En una realización específica, se pasa la solución de perfusión a través tanto de la vena umbilical como de las arterias umbilicales y se recoge después de exudar de la placenta. En otra realización específica, se pasa la solución de perfusión a través de la vena umbilical y se recoge de las arterias umbilicales, o se pasa a través de las arterias umbilicales y se recoge de la vena umbilical.

30 En diversas realizaciones, los citoblastos placentarios aislados contenidos en una población de células obtenida por perfusión de una placenta son al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o al menos un 99,5 % de dicha población de citoblastos placentarios. En otra realización específica, los citoblastos placentarios aislados recogidos por perfusión comprenden células fetales y maternas. En otra realización específica, los citoblastos placentarios aislados recogidos por perfusión son al menos en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o al menos un 99,5 % células fetales.

35 En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria una composición que comprende una población de citoblastos placentarios aislados, como se describe en la presente memoria, recogidos (aislados) por perfusión, en la que dicha composición comprende al menos una porción de la solución de perfusión usada para aislar los citoblastos placentarios.

40 Las poblaciones de citoblastos placentarios aislados descritas en la presente memoria pueden producirse digiriendo tejido placentario con una enzima disgregante de tejido para obtener una población de células placentarias que comprende los citoblastos placentarios, y aislando, o aislando sustancialmente, una pluralidad de citoblastos placentarios del resto de dichas células placentarias. Puede digerirse el total, o cualquier parte, de la placenta para obtener los citoblastos placentarios aislados descritos en la presente memoria. En realizaciones específicas, por ejemplo, dicho tejido placentario puede ser una placenta completa (p. ej., incluyendo el cordón umbilical), una membrana amniótica, corion, una combinación de amnios y corion o una combinación de cualquiera de los anteriores. En otras realizaciones específicas, la enzima disgregante de tejido es tripsina o colagenasa. En diversas realizaciones, los citoblastos placentarios aislados contenidos en una población de células obtenida por digestión de un placenta son al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o al menos un 99,5 % de dicha población de células placentarias.

50 Las poblaciones de citoblastos placentarios aislados descritas anteriormente, y poblaciones de citoblastos placentarios aislados en general, pueden comprender aproximadamente al menos, o no más de,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más de los citoblastos placentarios aislados. Las poblaciones de citoblastos placentarios aislados útiles en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria comprenden al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de citoblastos placentarios aislados viables, p. ej., como se determina, p. ej., por exclusión con azul de tripano.

55 Para cualquiera de los citoblastos placentarios o poblaciones de citoblastos placentarios anteriores, las células o población de citoblastos placentarios son, o pueden comprender, células que se han sometido a pasajes al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces o más, o expandido durante 1, 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 de población o más.

En una realización específica de cualquiera de los citoblastos placentarios o poblaciones de citoblastos placentarios anteriores, el cariotipo de las células, o de al menos aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 % de las células de dicha población, es normal. En otra realización específica de cualquiera de los citoblastos placentarios o poblaciones de citoblastos placentarios anteriores, las células, o células de la población de células, son de origen no materno.

Los citoblastos placentarios aislados, o poblaciones de citoblastos placentarios aislados, que portan cualquiera de las combinaciones anteriores de marcadores pueden combinarse en cualquier relación. Pueden aislarse dos o más cualesquiera de las poblaciones de citoblastos placentarios anteriores, o enriquecerse, formando una población de citoblastos placentarios. Por ejemplo, puede combinarse una población de citoblastos placentarios aislados que comprende una primera población de citoblastos placentarios definida por una de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente con una segunda población de citoblastos placentarios definida por otra de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente, en la que dichas primera y segunda poblaciones se combinan en una relación de aproximadamente 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2 o aproximadamente 99:1. De forma similar, pueden combinarse tres, cuatro, cinco o más cualesquiera de los citoblastos placentarios o poblaciones de citoblastos placentarios anteriormente descritos.

En una realización específica de los citoblastos placentarios anteriormente descritos, los citoblastos placentarios secretan constitutivamente IL-6, IL-8 y proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1).

Las poblaciones de células placentarias descritas anteriormente pueden comprender aproximadamente, al menos o no más de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $3,5 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $4,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5,5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $6,5 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $8,5 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $9,5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más citoblastos placentarios. En ciertas realizaciones, las poblaciones de citoblastos placentarios descritas anteriormente pueden comprender de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^6$ , de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$ , de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$ , de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$ , de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$ , de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$ , de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$ , de aproximadamente  $1 \times 10^9$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  o de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  citoblastos placentarios.

En ciertas realizaciones, los citoblastos placentarios útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria no expresan CD34, como se detecta por inmunolocalización, después de exposición a 1 a 100 ng/ml de VEGF durante 4 a 21 días. En una realización específica, dichos citoblastos placentarios son adherentes a un plástico de cultivo de tejido. En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios inducen a células endoteliales a formar brotes o estructuras de tipo tubo, p. ej., cuando se cultivan en presencia de un factor angiogénico tal como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), p. ej., sobre un sustrato tal como MATRIGEL™.

En otro aspecto, los citoblastos placentarios proporcionados en la presente memoria, o una población de células, p. ej., una población de citoblastos placentarios, o una población de células en la que al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las células de dicha población de células son citoblastos placentarios, 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 o galectina-1, p. ej., al medio de cultivo en que crece la célula o células. En otra realización, los citoblastos placentarios expresan niveles aumentados de CD202b, IL-8 y/o VEGF en condiciones hipóxicas (p. ej., menos de aproximadamente 5 % de O<sub>2</sub>) en comparación con condiciones normóxicas (p. ej., aproximadamente 20 % o aproximadamente 21 % de O<sub>2</sub>).

En otra realización, cualquiera de los citoblastos placentarios o poblaciones de células que comprenden citoblastos placentarios descritos en la presente memoria pueden causar la formación de brotes o estructuras de tipo tubo en una población de células endoteliales en contacto con dichos citoblastos placentarios. En una realización específica, se cocultivan los citoblastos placentarios con células endoteliales humanas, que forman brotes o estructuras de tipo tubo, o soportan la formación de brotes de células endoteliales, p. ej., cuando se cultivan en presencia de proteínas de matriz extracelular tales como colágeno de tipo I y IV y/o factores angiogénicos tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), p. ej., en o sobre un sustrato tal como colágeno placentario o MATRIGEL™ durante al menos 4 días. En otra realización, cualquiera de las poblaciones de células que comprenden citoblastos placentarios descritos en la presente memoria secretan factores angiogénicos tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o interleucina 8 (IL-8) y pueden inducir así a células endoteliales humanas a formar brotes o estructuras de tipo tubo cuando se cultivan en presencia de proteínas de matriz extracelular tales como colágeno de tipo I y IV, p. ej., en o sobre sustrato tal como colágeno placentario o MATRIGEL™.

En otra realización, cualquiera de las poblaciones anteriores de células que comprenden citoblastos placentarios secreta factores angiogénicos. En realizaciones específicas, la población de células secreta factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas

(PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y/o interleucina 8 (IL-8). En otras realizaciones específicas, la población de células que comprenden citoblastos placentarios secreta uno o más factores angiogénicos e induce así a células endoteliales humanas a migrar en un ensayo de curación de heridas *in vitro*. En otras realizaciones específicas, la población de células que comprende citoblastos placentarios induce la maduración, diferenciación o proliferación de células endoteliales humanas, progenitores endoteliales, miocitos o mioblastos.

#### 5.4.3 Selección y producción de poblaciones de células placentarias

En ciertas realizaciones, pueden seleccionarse poblaciones de citoblastos placentarios en las que la población es inmunosupresora. En una realización, por ejemplo, pueden seleccionarse citoblastos placentarios inmunosupresores a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una población de células placentarias en la que al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de dichas células son citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y en la que dichos citoblastos placentarios suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR). En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un método de selección de una pluralidad de citoblastos placentarios inmunosupresores a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una población de citoblastos placentarios en la que al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de dichas células son citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, y en la que dichos citoblastos placentarios suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR). En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende también seleccionar una pluralidad de células placentarias, p. ej., los citoblastos placentarios descritos anteriormente, que forman uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otro aspecto, se divulga en la presente memoria un método de selección de una pluralidad de citoblastos placentarios inmunosupresores a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una pluralidad de células placentarias en las que al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de dichas células son citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, y en el que dichos citoblastos placentarios suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR). En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende adicionalmente seleccionar una población de citoblastos placentarios que produce uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando la población se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otro aspecto, se proporciona también en la presente memoria un método de selección de una pluralidad de citoblastos placentarios inmunosupresores a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una pluralidad de células placentarias en las que al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de dichas células son citoblastos placentarios CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, y en el que dichas células placentarias suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR). En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también HLA-G<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>-</sup>.

En otro aspecto, se divulga en la presente memoria un método de selección de una pluralidad de citoblastos placentarios inmunosupresores a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una pluralidad de células placentarias en las que al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de dichas células son citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>-</sup>, y en el que dichas células placentarias suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR). En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios

que son también CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>.

- 5 En otro aspecto, se divulga también en la presente memoria un método de selección de una pluralidad de citoblastos placentarios inmunosupresores a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una pluralidad de células placentarias en las que al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de dichas células son citoblastos placentarios CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, y en el que dicha pluralidad forma uno o más cuerpos de tipo embrioide en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide. En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>.
- 10 En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también OCT-4<sup>+</sup>. En un aspecto más específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>.
- 15 En otro aspecto, se divulga en la presente memoria un método de selección de una pluralidad de citoblastos placentarios inmunosupresores a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una pluralidad de citoblastos placentarios en los que al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de dichas células placentarias aisladas son citoblastos placentarios OCT4<sup>+</sup>, y en el que dicha pluralidad forma uno o más cuerpos de tipo embrioide en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide. En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>.
- 20 En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD200<sup>+</sup>. En un aspecto más específico, dicha selección comprende seleccionar citoblastos placentarios que son también CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>.
- 25 Pueden producirse poblaciones inmunosupresoras, o pluralidades, de células placentarias según los métodos divulgados en la presente memoria. Por ejemplo, se divulga en la presente memoria un método de producción de una población celular que comprende seleccionar cualquiera de las pluralidades de citoblastos placentarios descritas anteriormente y aislar la pluralidad de citoblastos placentarios de otras células, p. ej. otras células placentarias. En un aspecto específico, se divulga en la presente memoria un método de producción de una población celular que comprende seleccionar citoblastos placentarios, en el que dichos citoblastos placentarios (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y no expresan HLA-G; o expresan CD73, CD105 y CD200; o expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105, y no expresan HLA-G; o expresan CD73 y CD105 y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende los citoblastos placentarios, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide; o expresan
- 30 OCT-4 y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende los citoblastos placentarios, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide y (c) suprimir detectablemente la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en un ensayo de MLR (reacción de linfocitos mixtos) o de regresión; y seleccionar dichos citoblastos placentarios o aislar dichos citoblastos placentarios de otras células para formar una población celular.
- 35 En un aspecto más específico, las poblaciones de citoblastos placentarios inmunosupresores pueden producirse mediante un método que comprende seleccionar citoblastos placentarios que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y no expresan HLA-G y (c) suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en una MLR (reacción de linfocitos mixtos) y aislar dichos citoblastos placentarios de otras células para formar una población celular. En otro aspecto específico, el método comprende seleccionar citoblastos placentarios que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y CD200, y (c) suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en una MLR; y aislar dichos citoblastos placentarios de otras células para formar una población celular. En otro aspecto específico, se divulga en la presente memoria un método de producción de una población celular que comprende seleccionar citoblastos placentarios que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y OCT-4 y (c) suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> T en una MLR; y aislar dichos citoblastos placentarios de otras células para formar una población celular. En otro aspecto específico, se divulga en la presente memoria un método de producción de una población celular que comprende seleccionar citoblastos placentarios que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide y (d) suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en una MLR; y aislar dichos citoblastos placentarios de otras células para formar una población celular. En otro aspecto específico, el método comprende seleccionar citoblastos placentarios que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, y no expresan HLA-G, y (c) suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en una MLR; y aislar dichos citoblastos placentarios de otras células para formar una población celular. En otro aspecto específico, el método comprende seleccionar citoblastos placentarios que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrioide y (d) suprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en una MLR; y aislar dichas células placentarias de otras células para formar una población celular.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

En un aspecto específico de los métodos de producción de una población de citoblastos placentarios inmunosupresores, dichos linfocitos T y dichos citoblastos placentarios están presentes en dicha MLR a una relación de aproximadamente 5:1. Los citoblastos placentarios usados en el método pueden derivar de placenta completa, o principalmente del amnios, o de amnios y corion. En otra realización específica, los citoblastos placentarios suprimen la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % en dicha MLR en comparación con la cantidad de proliferación de linfocitos T en dicha MLR en ausencia de dichos citoblastos placentarios. El método puede comprender adicionalmente la selección y/o producción de una población de citoblastos placentarios capaz de inmunomodulación, p. ej., supresión de la actividad de otras células inmunitarias, p. ej., una actividad de linfocitos citolíticos naturales (NK).

#### 10 5.4.4 Modelos de dolor

En ciertas realizaciones, los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria se caracterizan por su capacidad de reducir o mejorar el dolor, p. ej. en un modelo de dolor animal. Por ejemplo, cuando se produce una partida o lote de citoblastos placentarios, puede ensayarse una muestra de la partida o lote usando uno o más modelos de dolor animal. Los citoblastos placentarios de los que se han obtenido muestras que producen reducciones aceptables del dolor en un ensayo de dolor pueden seleccionarse entonces para uso adicional, p. ej., para la mejora de cualquier tipo de dolor, o para la mejora de un tipo específico de dolor. Debería entenderse que los citoblastos placentarios ensayados tienen que ensayarse y/o mostrar eficacia solo en un ensayo para ser considerados terapéuticamente eficaces; no es necesario ensayar en múltiples, o todos, los modelos de dolor animal. En ciertas realizaciones, los citoblastos placentarios de muestra pueden ensayarse en un ensayo de dolor que sea relevante para uno o más tipos relacionados de dolor, o dolor relevante para tratar una población de pacientes particular.

En ciertos aspectos, los citoblastos placentarios pueden ensayarse, por ejemplo, en un modelo de dolor visceral inducido por ácido acético. Tal estudio puede realizarse, p. ej., administrando ácido acético por vía intraperitoneal a un volumen de dosis de aproximadamente 10 ml/kg a ratones, con vehículo o citoblastos placentarios (p. ej.,  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$ ) administrado antes de la administración de ácido acético. Se registra el número de retorcimientos durante los 20 minutos posteriores después de descartar los primeros 5 minutos. Cada experimento contiene los siguientes grupos: vehículo + 2-5 dosis de citoblastos placentarios + control positivo; n= 10/grupo.

En ciertas otras realizaciones, una muestra de citoblastos placentarios puede ensayarse usando el modelo de ligadura del nervio espinal de Chung con los nervios espinales L5 y L6 ligados estrechamente, dando como resultado un dolor neuropático estable y duradero.

En ciertas otras realizaciones, una muestra de citoblastos placentarios puede ensayarse usando un ensayo de neuropatía periférica por taxol en que el dolor se desarrolla con el tiempo en la rata después de la administración de una serie de inyecciones de taxol.

En ciertas otras realizaciones, una muestra de citoblastos placentarios puede ensayarse usando el modelo de dolor neuropático de Bennet (alodinia) en que se muestra dolor, inducido por la aplicación de ligaduras sueltas alrededor de uno de los nervios ciáticos, por la retirada brusca de la zarpa trasera afectada ante estímulos mecánicos ligeros.

En ciertas otras realizaciones, una muestra de citoblastos placentarios puede ensayarse usando un modelo de dolor inducido por la administración de carragenano.

En ciertas otras realizaciones, una muestra de citoblastos placentarios puede ensayarse usando un modelo de dolor neuropático por coadyuvante completo de Freund (p. ej., alodinia). Por ejemplo, pueden usarse 5 ratas por grupo, con una dosis inicial de, p. ej.,  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  i.v., con la eficacia determinada por la reducción de la hiperalgesia de zarpa trasera inducida por CFA. Se aplica una prueba de t de Student para comparación entre los grupos de control y tratados. Pueden usarse otras medicaciones del dolor como controles positivos (mg/kg oral), p. ej., aspirina > 100; ciclosporina A > 100; dexametasona > 30; gabapentina ~ 200; indometacina > 10 o morfina 30.

En ciertas otras realizaciones, una muestra de citoblastos placentarios puede ensayarse usando fenilquinona (PQ) como compuesto generador de dolor, p. ej., usando cinco ratones por condición, una dosis inicial de, p. ej.,  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  i.v. y 1 h de pretratamiento, seguido de la determinación de la reducción de los retorcimientos inducidos por PQ (2 mg/kg i.p.) durante un periodo de observación de 5 min.

En ciertos otros aspectos, una muestra de citoblastos placentarios puede ensayarse usando un modelo de incisión de zarpa trasera de, p. ej., dolor posoperatorio.

En ciertos otros aspectos, una muestra de citoblastos placentarios puede ensayarse usando un modelo de movimiento de la cola, en que se valora la respuesta al estímulo de dolor por movimiento de la cola antes y después de la administración de los citoblastos placentarios.

Los ensayos de dolor proporcionados en la presente memoria son solo ejemplos no limitantes; pueden usarse también otros ensayos conocidos en la materia.

#### 55 5.4.5 Crecimiento en cultivo

El crecimiento de células placentarias, p. ej., los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria, como para cualquier célula de mamífero, depende en parte del medio particular seleccionado para crecimiento. En condiciones óptimas, los citoblastos placentarios duplican típicamente su número en 3-5 días. Durante el cultivo, los citoblastos placentarios proporcionados en la presente memoria se adhieren a un sustrato en cultivo, p. ej. la superficie de un recipiente de cultivo de tejido (p. ej., plástico de disco de cultivo de tejido, plástico recubierto de fibronectina y similares) y forman una monocapa.

Las poblaciones de células placentarias aisladas que comprenden los citoblastos placentarios proporcionados en la presente memoria, cuando se cultivan en condiciones apropiadas, pueden formar cuerpos de tipo embrioide, es decir, agrupamientos tridimensionales de células crecidas sobre la capa de citoblastos adherentes. Las células en los cuerpos de tipo embrioide expresan marcadores asociados a citoblastos muy tempranos, p. ej., OCT-4, Nanog, SSEA3 y SSEA4. Las células en cuerpos de tipo embrioide son típicamente no adherentes al sustrato de cultivo como los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria, sino que permanecen fijadas a las células adherentes durante el cultivo. Los cuerpos celulares de tipo embrioide dependen de los citoblastos placentarios adherentes para su viabilidad, ya que los cuerpos de tipo embrioide no se forman en ausencia de citoblastos adherentes. Las células placentarias adherentes facilitan por tanto el crecimiento de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende las células placentarias adherentes. Los citoblastos mesenquimatosos, p. ej. citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea, no desarrollan cuerpos de tipo embrioide en cultivo.

#### 5.4.6 Diferenciación

Las células placentarias útiles en los métodos de tratamiento del dolor en un individuo proporcionadas en la presente memoria, en ciertas realizaciones, son diferenciables en linajes celulares dedicados diferentes. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las células placentarias pueden diferenciarse en células de linaje adipogénico, condrogénico, neurogénico u osteogénico. Tal diferenciación puede lograrse, p. ej., mediante cualquier método conocido en la materia para diferenciar, p. ej. citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea, en linajes celulares similares, o mediante métodos descritos en otro lugar de la presente memoria. Se divulgan métodos específicos de diferenciación de células placentarias en linajes celulares particulares, p. ej., en la patente de EE. UU. n° 7.311.905 y en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n° 2007/0275362.

Los citoblastos placentarios proporcionados en la presente memoria pueden exhibir la capacidad de diferenciarse en un linaje celular particular *in vitro*, *in vivo* o *in vitro e in vivo*. En una realización específica, los citoblastos placentarios proporcionados en la presente memoria pueden diferenciarse *in vitro* cuando se disponen en condiciones que causan o promueven la diferenciación en un linaje celular particular, pero no se diferencian detectablemente *in vivo*, p. ej., en un modelo de ratón NOD-SCID.

### 5.5 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE CITOBLASTOS PLACENTARIOS

#### 5.5.1 Composición de recogida de citoblastos

Los citoblastos placentarios pueden recogerse y aislarse según los métodos proporcionados en la presente memoria. En general, los citoblastos placentarios se obtienen a partir de una placenta de mamífero usando una solución fisiológicamente aceptable, p. ej., una composición de recogida de citoblastos. Se describe con detalle una composición de recogida de citoblastos en la solicitud provisional de EE. UU. relacionada n° 60/754.969, titulada "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental cells and Methods of Using the Composition", presentada el 29 de diciembre de 2005.

La composición de recogida de citoblastos puede comprender cualquier solución fisiológicamente aceptable adecuada para la recogida y/o cultivo de citoblastos, por ejemplo una solución salina (p. ej., solución salina tamponada con fosfato, solución de Krebs, solución de Krebs modificada, solución de Eagle, NaCl al 0,9 %, etc.), un medio de cultivo (p. ej., DMEM, HDMEM, etc.) y similares.

La composición de recogida de citoblastos puede comprender uno o más componentes que tienden a conservar los citoblastos placentarios, es decir, previenen la muerte de citoblastos placentarios o retardan la muerte de citoblastos placentarios, reducen el número de citoblastos placentarios en una población de células que mueren o similares, desde el momento de recogida hasta el momento de cultivo. Tales componentes pueden ser, p. ej., un inhibidor de la apoptosis (p. ej., un inhibidor de caspasa o inhibidor de JNK); un vasodilatador (p. ej., sulfato de magnesio, un fármaco antihipertensivo, péptido natriurético auricular (ANP), adrenocorticotropina, hormona de liberación de corticotropina, nitroprusiato de sodio, hidralazina, trifosfato de adenosina, adenosina, indometacina o sulfato de magnesio, un inhibidor de fosfodiesterasa, etc.) un inhibidor de la necrosis (p. ej., 2-(1H-indol-3-il)-3-pentilaminomaleimida, ditiocarbamato de pirrolidina o clonazepam); un inhibidor de TNF- $\alpha$  y/o un perfluorocarbono portador de oxígeno (p. ej., bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

La composición de recogida de citoblastos puede comprender una o más enzimas degradantes de tejido, p. ej., una metaloproteasa, una serinoproteasa, una proteasa neutra, una ARNasa o una ADNasa o similares. Tales enzimas incluyen, pero sin limitación, colagenasas (p. ej., colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASE, hialuronidasa y similares.

La composición de recogida de citoblastos puede comprender una cantidad bactericida o bacteriostática eficaz de un antibiótico. En ciertas realizaciones no limitantes, el antibiótico es un macrólido (p. ej., tobramicina), una cefalosporina (p. ej., cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxilo), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (p. ej., penicilina V) o una quinolona (p. ej., ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En una realización particular, el antibiótico es activo contra bacterias Gram(+) y/o Gram(-), p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y similares.

La composición de recogida de citoblastos puede comprender también uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM); iones de magnesio (de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); una macromolécula de peso molecular mayor de 20.000 dáltones, en una realización, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad endotelial y la viabilidad celular (p. ej., 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 de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (p. ej., hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presentes de aproximadamente 25 µM a aproximadamente 100 µM); un agente reductor (p. ej., N-acetilcisteína, presente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que previene la entrada de calcio en las células (p. ej., verapamilo presente de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 25 µM); nitroglicerina (p. ej., de aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 0,2 g/l); un anticoagulante, en una realización, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de sangre residual (p. ej., heparina o hirudina presente a una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l) o un compuesto que contiene amilorida (p. ej., amilorida, etilisopropilamilorida, hexametilamilorida, dimetilamilorida o isobutilamilorida presente de aproximadamente 1,0 µM a aproximadamente 5 µM).

### 5.5.2 Recogida y manejo de placenta

En general, se recupera una placenta humana poco después de su expulsión después del nacimiento. En una realización preferida, la placenta se recupera de una paciente después del consentimiento informado y después de tomar el historial médico completo de la paciente y asociarlo con la placenta. Preferiblemente, el historial médico continúa después del parto. Tal historial médico puede usarse para coordinar el uso posterior de la placenta o los citoblastos recolectados de la misma. Por ejemplo, pueden usarse células placentarias humanas, a la vista del historial médico, para medicina personalizada para el lactante asociado a la placenta, o para los padres, hermanos u otros parientes del lactante.

Antes de la recuperación de los citoblastos placentarios, se retiran la sangre del cordón umbilical y la sangre placentaria. En ciertas realizaciones, después del parto, se recupera la sangre del cordón en la placenta. La placenta puede someterse a un proceso de recuperación de sangre de cordón convencional. Típicamente, se usa una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para desangrar la placenta (véanse, p. ej., Anderson, patente de EE. UU. nº 5.372.581; Hessel et al., patente de EE. UU. nº 5.415.665). La aguja o cánula se dispone habitualmente en la vena umbilical y la placenta puede masajearse suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón de la placenta. Tal recuperación de sangre del cordón puede efectuarse comercialmente, p. ej., LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry y Cryocell. Preferiblemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional para minimizar la disgregación de tejido durante la recuperación de sangre del cordón.

Típicamente, se transporta una placenta del paritorio o sala de partos a otra localización, p. ej. un laboratorio, para la recuperación de la sangre de cordón y la recogida de citoblastos, p. ej., por perfusión o disociación de tejido. La placenta se transporta preferiblemente en un dispositivo de transporte estéril térmicamente aislado (que mantiene la temperatura de la placenta a entre 20-28 °C), por ejemplo disponiendo la placenta, con el cordón umbilical proximal pinzado, en una bolsa de plástico con cierre de cremallera estéril, que se dispone entonces en un recipiente aislado. En otra realización, se transporta la placenta en un kit de recogida de sangre de cordón sustancialmente como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos pendiente nº 11/230.760, presentada el 19 de septiembre de 2005. Preferiblemente, la placenta se suministra al laboratorio de 4 a 24 horas después del parto. En ciertas realizaciones, el cordón umbilical proximal se pinza, preferiblemente a 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de sangre del cordón. En otras realizaciones, el cordón umbilical proximal se pinza después de la recuperación de sangre del cordón pero antes del procesamiento posterior de la placenta.

La placenta, antes de la recogida de citoblastos placentarios, puede almacenarse en condiciones estériles y a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25 °C (centígrados). La placenta puede almacenarse durante un periodo de más de 48 horas, y preferiblemente durante un periodo de 4 a 24 horas antes de perfundir la placenta para retirar cualquier sangre del cordón residual. La placenta se almacena preferiblemente en una solución anticoagulante a una temperatura de 5 a 25 °C (centígrados). Las soluciones anticoagulantes son bien conocidas en la materia. Por ejemplo, puede usarse una solución de heparina o warfarina de sodio. En una realización preferida, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (p. ej., 1 % p/p en solución 1:1000). La placenta desangrada se almacena preferiblemente durante no más de 36 horas antes de recoger las células placentarias.

La placenta de mamífero, o una parte de la misma, una vez recogida y preparada en general como anteriormente, puede tratarse de cualquier manera conocida en la materia, p. ej. puede perfundirse o disgregarse, p. ej., digerirse con

una o más enzimas disgregantes de tejido, obteniendo citoblastos.

### 5.5.3 Disgregación física y digestión enzimática de tejido placentario

En una realización, se recogen citoblastos placentarios de una placenta de mamífero por disgregación física, p. ej. digestión enzimática, del órgano, p. ej. usando la composición de recogida de citoblastos descrita en la sección 5.6.1 anterior. Por ejemplo, la placenta, o una porción de la misma, puede, p. ej., triturarse, cizallarse, trocearse, picarse, desmenuzarse, macerarse o similares, mientras está en contacto, p. ej., con un tampón, medio o composición de recogida de citoblastos, y digerirse el tejido posteriormente con una o más enzimas. La placenta, o una porción de la misma, puede también disgregarse físicamente y digerirse con una o más enzimas, y sumergirse el material resultante en, o mezclarse con, un tampón, medio o composición de recogida de citoblastos. Puede usarse cualquier método de disgregación física, a condición de que el método de disgregación permita una pluralidad, más preferiblemente una mayoría, y más preferiblemente al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células en dicho órgano viables, como se determina, p. ej. por exclusión con azul de tripano.

Típicamente, las células placentarias pueden obtenerse por disgregación de un pequeño bloque de tejido placentario, p. ej., un bloque de tejido placentario que es de 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, 800, 900 o aproximadamente 1000 milímetros cúbicos de volumen.

La digestión enzimática puede efectuarse usando enzimas individuales o combinaciones de enzimas. En una realización, la digestión enzimática de tejido placentario usa una combinación de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica para la digestión de ácido hialurónico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa y hialuronidasa o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, Ind.) e hialuronidasa. Otras enzimas que pueden usarse para disgregar tejido de placenta incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serinproteasas tales como tripsina, quimotripsina o elastasa. Las serinproteasas pueden inhibirse por alfa-2-microglobulina en suero y por lo tanto el medio usado para digestión está habitualmente libre de suero. Se usan comúnmente EDTA y ADNasa en los procedimientos de digestión enzimática para aumentar la eficacia de la recuperación celular. El digestato se diluye preferiblemente para evitar atrapar los citoblastos en la digestión viscosa.

Las concentraciones típicas para enzimas de digestión de tejidos incluyen, p. ej., 50-200 U/ml de colagenasa I y colagenasa IV, 1-10 U/ml de dispasa y 10-100 U/ml de elastasa. Las proteasas pueden usarse en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o pueden usarse secuencialmente para liberar células placentarias. Por ejemplo, en una realización, se digiere en primer lugar una placenta, o parte de la misma, con una cantidad apropiada de colagenasa I a 2 mg/ml durante 30 minutos, seguido de la digestión con tripsina, al 0,25 %, durante 10 minutos a 37 °C. Las serinproteasas se usan preferiblemente consecutivamente después del uso de otras enzimas.

En otra realización, el tejido puede disgregarse adicionalmente por la adición de un quelante, p. ej. ácido etilenglicolbis-(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la composición de recogida de citoblastos que comprende los citoblastos, o a una solución en que se disgrega el tejido y/o se digiere antes del aislamiento de los citoblastos placentarios con la composición de recogida de citoblastos.

Se apreciará que, cuando se digiere una placenta entera, o una porción de placenta que comprende tanto células fetales como maternas (por ejemplo, cuando la porción de la placenta comprende el corion o cotiledones) para obtener citoblastos placentarios, las células placentarias recogidas comprenderán una mezcla de células placentarias derivadas de fuentes tanto fetales como maternas. Cuando se usa una porción de la placenta que no comprende, o comprende un número despreciable de, células maternas (por ejemplo, amnios) para obtener citoblastos placentarios, los citoblastos placentarios recogidos comprenderán casi exclusivamente citoblastos placentarios fetales.

### 5.5.4 Perfusión placentaria

Los citoblastos placentarios pueden obtenerse también por perfusión de placenta de mamífero. Se divulgan métodos de perfusión de placenta de mamífero para obtener citoblastos, p. ej., en Hariri, publicación de solicitud de EE. UU. nº 2002/0123141, y en la solicitud provisional de EE. UU. relacionada nº 60/754.969, titulada "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental cells and Methods of Using the Composition", presentada el 29 de diciembre de 2005.

Los citoblastos placentarios pueden recogerse por perfusión, p. ej. a través de los vasos placentarios usando, p. ej., una composición de recogida de citoblastos como solución de perfusión. En una realización, se perfunde una placenta de mamífero por el paso de una solución de perfusión a través de cualquiera o ambos de la arteria umbilical y la vena umbilical. El flujo de solución de perfusión a través de la placenta puede lograrse usando, p. ej., el flujo gravitatorio a la placenta. Preferiblemente, se fuerza la solución de perfusión a través de la placenta usando una bomba, p. ej., una bomba peristáltica. La vena umbilical, p. ej., puede canularse con un cánula, p. ej., una cánula de TEFLON® o plástico, que está conectada con un aparato de conexión estéril tal como una tubería estéril. El aparato de conexión estéril está conectado con un colector de perfusión.

En la preparación para perfusión, la placenta se orienta preferiblemente (p. ej. se suspende) de tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical se localicen en el punto más alto de la placenta. La placenta puede perfundirse por paso de un fluido de perfusión, p. ej., la composición de recogida de citoblastos proporcionada en la presente memoria, a través de los vasos placentarios, o a través de los vasos placentarios y el tejido circundante. En una realización, la arteria umbilical y la vena umbilical se conectan simultáneamente con una pipeta que se conecta a través de un conector flexible con un depósito de solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa a la vena y arteria umbilicales. La solución de perfusión se exuda y/o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos a los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un vaso abierto adecuado de la superficie de la placenta que estaba fijada al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión puede introducirse también a través de la abertura del cordón umbilical y permitirse fluir o percolar por fuera de las aberturas de la pared de la placenta que interconectaba con la pared uterina materna. En otra realización, se pasa la solución de perfusión a través de las venas umbilicales y se recoge de la arteria umbilical, o se pasa a través de la arteria umbilical y se recoge de las venas umbilicales.

En una realización, se pinza el cordón umbilical proximal durante la perfusión, y más preferiblemente, se pinza a 4-5 cm (centímetros) de la inserción del cordón en el disco placentario.

La primera recogida de flujo de perfusión de una placenta de mamífero durante el proceso de desangrado está en general coloreada con glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón y/o sangre placentaria; esta porción de la perfusión puede descartarse. El fluido de perfusión se vuelve más incoloro a medida que prosigue la perfusión y los glóbulos rojos del cordón residual se separan por lavado de la placenta.

El volumen del líquido de perfusión usado para recoger citoblastos placentarios puede variar dependiendo del número de citoblastos placentarios para recoger, del tamaño de la placenta, del número de recogidas para realizar de una placenta individual, etc. En diversas realizaciones, el volumen de líquido de perfusión puede ser de 50 ml a 5000 ml, de 50 ml a 4000 ml, de 50 ml a 3000 ml, de 100 ml a 2000 ml, de 250 ml a 2000 ml, de 500 ml a 2000 ml o de 750 ml a 2000 ml. Típicamente, la placenta se perfunde con 700-800 ml de líquido de perfusión después del desangrado.

La placenta puede perfundirse una pluralidad de veces durante el transcurso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se va a perfundir una pluralidad de veces, puede mantenerse o cultivarse en condiciones asépticas en un recipiente u otro vaso adecuado, y perfundirse con la composición de recogida de citoblastos o solución de perfusión estándar (p. ej., una solución salina normal tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (p. ej., heparina, warfarina de sodio, cumarina, bishidroxicumarina) y/o con o sin un agente antimicrobiano (p. ej.,  $\beta$ -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomycin (p. ej., a 40-100  $\mu$ g/ml), penicilina (p. ej., a 40 U/ml), anfotericina B (p. ej., a 0,5  $\mu$ g/ml). En una realización, se mantiene o cultiva una placenta aislada durante un periodo de tiempo sin recoger el perfusato, de tal modo que la placenta se mantiene o cultiva durante 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 2 o 3 o más días antes de la perfusión y recogida del perfusato. La placenta perfundida puede mantenerse una o más veces adicionales, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más horas, y perfundirse una segunda vez, p. ej., con 700-800 ml de fluido de perfusión. La placenta puede perfundirse 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En una realización preferida, la perfusión de la placenta y la recogida de la solución de perfusión, p. ej. composición de recogida de citoblastos, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfusatos en diferentes puntos temporales pueden procesarse además individualmente para recuperar poblaciones dependientes del tiempo de citoblastos placentarios. Los perfusatos de diferentes puntos temporales pueden también combinarse.

Sin desear ligarse a teoría alguna, después del desangrado y un tiempo suficiente de perfusión de la placenta, se cree que los citoblastos placentarios migran a la microcirculación desangrada y perfundida de la placenta, donde son recogibles, preferiblemente por lavado en un vaso de recogida por perfusión. Perfundir la placenta aislada no solo sirve para retirar la sangre del cordón residual, sino que proporciona también a la placenta los nutrientes apropiados, incluyendo oxígeno. La placenta puede cultivarse y perfundirse con una solución similar a la que se usó para retirar las células de sangre de cordón residuales, preferiblemente sin la adición de agentes anticoagulantes.

Los citoblastos pueden aislarse de la placenta por perfusión con una solución que comprende una o más proteasas u otras enzimas degradantes de tejido. En una realización específica, se lleva una placenta o porción de la misma a 25-37 °C y se incuba con una o más enzimas degradantes de tejido en 200 ml de medio de cultivo durante 30 minutos. Se recogen las células del perfusato, se llevan a 4 °C y se lavan con una mezcla inhibidora fría que comprende EDTA 5 mM, ditiotreitól 2 mM y beta-mercaptoetanol 2 mM. Se lavan los citoblastos placentarios después de varios minutos con una composición de recogida de citoblastos fría (p. ej. 4°C) descrita en otro lugar de la presente memoria.

La perfusión usando el método de cubeta, es decir, mediante el cual se recoge el perfusato después de exudar del lado materno de la placenta, da como resultado una mezcla de células fetales y maternas. Como resultado, las células recogidas mediante este método comprenden una población mixta de citoblastos placentarios de origen tanto fetal como materno. En contraposición, la perfusión únicamente a través de los vasos placentarios, mediante la cual el fluido de perfusión pasa a través de uno o dos vasos placentarios y se recoge únicamente a través del vaso o vasos restantes, da como resultado la recogida de una población de citoblastos placentarios de origen casi exclusivamente fetal.

### 5.5.5 Aislamiento, clasificación y caracterización de células placentarias

- Los citoblastos de placenta de mamífero, obtenidos por perfusión o por digestión enzimática, pueden purificarse inicialmente (concretamente aislarse) a partir de otras células por centrifugación con gradiente de Ficoll. Tal centrifugación puede seguir cualquier protocolo estándar para velocidad de centrifugación, etc. En una realización, por ejemplo, las células recogidas de la placenta se recuperan del perfusato por centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, que separa las células de, p. ej., desechos contaminantes y plaquetas. En otra realización, se concentra el perfusato placentario a aproximadamente 200 ml, se deposita suavemente sobre Ficoll y se centrifuga a aproximadamente 1100 x g durante 20 minutos a 22 °C, y se recoge la capa de células de interfase de baja densidad para procesamiento adicional.
- Los sedimentos celulares pueden resuspenderse en una composición de recogida de citoblastos recientes, o un medio adecuado para el mantenimiento de citoblastos, p. ej. medio IMDM libre de suero que contiene 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY). La fracción celular mononuclear total puede aislarse, p. ej., usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) según el procedimiento recomendado por el fabricante.
- Como se usa en la presente memoria, "aislar" citoblastos placentarios significa retirar al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células con que los citoblastos placentarios están normalmente asociados en la placenta de mamífero intacta.
- Los citoblastos placentarios obtenidos por perfusión o digestión pueden aislarse, por ejemplo, adicional o inicialmente, por tripsinación diferencial usando, p. ej., una solución de 0,05 % de tripsina con 0,2 % de EDTA (Sigma, St. Louis MO). La tripsinación diferencial es posible porque los citoblastos placentarios se desprenden típicamente de las superficies plásticas en aproximadamente 5 minutos, mientras que otras poblaciones adherentes requieren típicamente más de 20-30 minutos de incubación. Los citoblastos placentarios desprendidos pueden recolectarse después de tripsinación y neutralización de tripsina, usando p. ej., solución neutralizante de tripsina (TNS, Cambrex).
- En una realización de aislamiento de citoblastos placentarios, se disponen alícuotas de, por ejemplo aproximadamente 5-10 x 10<sup>6</sup> células placentarias en cada uno de varios matraces T-75, preferiblemente matraces T75 recubiertos con fibronectina. En tal realización, las células pueden cultivarse con medio de crecimiento de citoblastos mesenquimatosos (MSCGM) (Cambrex) disponible comercialmente y disponerse en una incubadora de cultivo de tejido (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). Después de 10 a 15 días, se retiran las células no adherentes de los matraces por lavado con PBS. Se reemplaza entonces el PBS por MSCGM. Se examina preferiblemente en los matraces diariamente la presencia de diversos tipos celulares adherentes y, en particular, la identificación y expansión de agrupamientos de células fibroblastoides.
- El número y tipo de células recogidas de una placenta de mamífero pueden monitorizarse, por ejemplo, midiendo los cambios de morfología y marcadores de superficie celular usando técnicas de detección celular estándares tales como citometría de flujo, clasificación celular, inmunocitoquímica (p. ej., tinción con anticuerpos específicos de tejido o específicos de marcador celular), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), clasificación celular activada magnética (MACS), por examen de la morfología de las células usando microscopía óptica o confocal, y/o por medida de los cambios de la expresión génica usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como PCR y análisis del perfil de expresión génica. Estas técnicas pueden usarse, también, para identificar células que son positivas de uno o más marcadores particulares. Por ejemplo, usando anticuerpos de CD34, puede determinarse, usando las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34 en comparación con, por ejemplo, un control isotípico; en ese caso la célula es CD34<sup>+</sup>. Igualmente, si una célula produce suficiente ARN de OCT-4 para ser detectable por RT-PCR, o significativamente más ARN de OCT-4 que una célula diferenciada terminalmente, la célula es OCT-4<sup>+</sup>. Los anticuerpos de marcadores de superficie celular (p. ej., marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de genes específicos de citoblastos, tales como OCT-4, son bien conocidos en la materia.
- Las células placentarias, particularmente células que se han aislado por separación de Ficoll, adherencia diferencial o una combinación de ambas, pueden clasificarse, p. ej. aislarse adicionalmente, usando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). La clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluyendo células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (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 partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos o ligandos específicos de marcador de superficie celular están marcados con marcajes fluorescentes distintos. Las células se procesan a través del clasificador celular, permitiendo la separación de células basada en su capacidad de unirse a los anticuerpos usados. Las partículas clasificadas por FACS pueden depositarse directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o 384 pocillos para facilitar la separación y clonación.
- En un esquema de clasificación, los citoblastos placentarios pueden clasificarse basándose en la expresión de los marcadores CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 y/o HLA-G, o cualquiera de los otros marcadores enumerados en otro lugar de la presente memoria. Esto puede lograrse en conexión con procedimientos para seleccionar citoblastos basándose en sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, la selección por adherencia de citoblastos placentarios puede lograrse antes o después de clasificar basándose en la expresión de

5 marcador. En un aspecto, por ejemplo, los citoblastos placentarios pueden clasificarse en primer lugar basándose en su expresión de CD34: las células CD34<sup>-</sup> se retienen y las células que son CD200<sup>+</sup> o HLA-G<sup>+</sup> se separan de todas las demás células CD34<sup>-</sup>. En otro aspecto, los citoblastos placentarios pueden clasificarse basándose en su expresión de CD200 y/o HLA-G, o falta de la misma; por ejemplo las células que manifiestan cualquiera de estos marcadores pueden aislarse para uso adicional. Las células que expresan, p. ej., CD200 y/o HLA-G pueden clasificarse además, en una realización específica, basándose en su expresión de CD73 y/o CD105, o en epítomos reconocidos por anticuerpos de SH2, SH3 o SH4, o la falta de expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, en un aspecto, los citoblastos placentarios se clasifican por la expresión, o falta de la misma, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y los citoblastos placentarios que son CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup> se aíslan de otras células placentarias para uso adicional.

10 En otra realización, pueden usarse perlas magnéticas para separar células, p. ej. separar citoblastos placentarios de otras células placentarias. Las células pueden clasificarse usando una técnica de clasificación celular activada magnéticamente (MACS), un método para separar partículas basado en su capacidad de unirse a perlas magnéticas (0,5-100 µm de diámetro). Pueden efectuarse una variedad de modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de anticuerpo que reconoce específicamente una molécula de superficie celular o hapteno particular. Las perlas se mezclan entonces con las células para permitir la unión. Se pasan entonces las células a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de superficie celular específico. En una realización, estas células pueden entonces aislarse y remezclarse con las perlas magnéticas acopladas con un anticuerpo contra marcadores de superficie celular adicionales. Se pasan de nuevo las células a través de un campo magnético, aislando las células que se unen a ambos anticuerpos. Tales células pueden diluirse entonces en discos separados, tales como discos de microvaloración para aislamiento clonal.

15 Los citoblastos placentarios pueden caracterizarse y/o clasificarse también basándose en la morfología celular y las características de crecimiento. Por ejemplo, los citoblastos placentarios pueden caracterizarse por tener, y/o seleccionarse basándose en, p. ej., una apariencia fibroblastoide en cultivo. Los citoblastos placentarios pueden caracterizarse también por tener, y/o seleccionarse basándose en, la capacidad de formar cuerpos de tipo embrioide. En una realización, por ejemplo, las células placentarias que son de forma fibroblastoide, expresan CD73 y CD105 y producen uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo pueden aislarse de otras células placentarias. En otra realización, se aíslan de otras células placentarias células placentarias OCT-4<sup>+</sup> que producen uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo.

20 En otra realización, los citoblastos placentarios pueden identificarse y caracterizarse por un ensayo de unidad formadora de colonia. Los ensayos de unidad formadora de colonia son comúnmente conocidos en la materia, tales como el medio MESENCULT™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Columbia Británica).

25 En los citoblastos placentarios puede valorarse la viabilidad, potencial de proliferación y longevidad usando técnicas estándares conocidas en la materia, tales como ensayo de exclusión con azul de tripano, ensayo de captación de diacetato de fluoresceína, ensayo de captación de yoduro de propidio (para valorar la viabilidad) y ensayo de captación de timidina y ensayo de proliferación de células MTT (para valorar la proliferación). La longevidad puede determinarse mediante métodos bien conocidos en la materia, tales como determinar el número máximo de duplicaciones de población en un cultivo extendido.

30 Los citoblastos placentarios pueden separarse también de otras células placentarias usando otras técnicas conocidas en la materia, p. ej., crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células indeseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta tal como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación-descongelación; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación a contracorriente); separación gravitatoria unitaria; distribución a contracorriente; electroforesis y similares.

## 35 5.6 CULTIVO DE CITOBLASTOS PLACENTARIOS

### 5.6.1 Medios de cultivo

40 Los citoblastos placentarios aislados, o poblaciones de células placentarias, o células o tejido placentario de los que proceden las células placentarias, pueden usarse para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células se transfieren en general a vasos de cultivo de tejido estériles no recubiertos o recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (p. ej., nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina y proteína de membrana extracelular (p. ej., MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

45 Los citoblastos placentarios pueden cultivarse en cualquier medio, y en cualquier condición, reconocidos en la materia como aceptables para el cultivo de citoblastos. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende suero. Los citoblastos placentarios pueden cultivarse, por ejemplo, en DMEM-LG (medio esencial modificado por Dulbecco, bajo en glucosa)/MCDB 201 (medio basal de fibroblasto de pollo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA+BSA (ácido linoleico-seroalbúmina bovina), dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1 y penicilina/estreptomocina; DMEM-HG (alto en glucosa) que comprende un 10 % de suero fetal de ternero (FBS); DMEM-HG que comprende un 15 % de FBS; IMDM (medio de Dulbecco modificado por Iscove) que comprende un 10 % de FBS, un 10 % de suero

equino e hidrocortisona; M199 que comprende un 10 % de FBS, EGF y heparina;  $\alpha$ -MEM (medio esencial mínimo) que comprende un 10 % de FBS, GlutaMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende un 10 % de FBS, GlutaMAX™ y gentamicina, etc. Es un medio preferido DMEM-LG/MCDB-201 que comprende un 2 % de FBS, ITS, LA+BSA, dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF y penicilina/estreptomina.

- 5 Otros medios que pueden usarse para cultivar citoblastos placentarios incluyen DMEM (alto o bajo en 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 citoblastos mesenquimatosos (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE.

- 10 El medio de cultivo puede suplementarse con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero (p. ej., suero fetal bovino (FBS), preferiblemente aproximadamente un 2-15 % (v/v); suero equino (de caballo) (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferiblemente aproximadamente un 0,001 % (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo factor de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, solos o en combinación.

Cualquiera de los métodos y medios de cultivo divulgados en la presente memoria puede usarse para cultivar y propagar citoblastos placentarios, también.

20 **5.6.2** Expansión y proliferación de citoblastos placentarios

- Una vez se aíslan los citoblastos placentarios (p. ej., separados de al menos un 50 % de las células placentarias con las que el citoblasto o población de citoblastos está normalmente asociado *in vivo*), el citoblasto o población de citoblastos puede proliferar y expandirse *in vitro*. De forma similar, una vez se producen los citoblastos placentarios, tales células pueden también proliferar y expandirse *in vitro*. Por ejemplo, los citoblastos placentarios pueden cultivarse en recipientes de cultivo de tejido, p. ej., discos, matraces, placas multipocillos o similares, durante un tiempo suficiente para que los citoblastos placentarios proliferen a 70-90 % de confluencia, es decir, hasta que los citoblastos placentarios y su progenie ocupen el 70-90 % del área de la superficie de cultivo del recipiente de cultivo de tejido.

- Los citoblastos placentarios pueden sembrarse en vasos de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. Por ejemplo, los citoblastos placentarios pueden sembrarse desde a una baja densidad (p. ej., de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 células/cm<sup>2</sup>) a una alta densidad (p. ej., aproximadamente 50.000 o más células/cm<sup>2</sup>). En una realización preferida, los citoblastos placentarios se cultivan a aproximadamente 0 a aproximadamente 5 % en volumen de CO<sub>2</sub> en aire. En algunas realizaciones preferidas, los citoblastos placentarios se cultivan a aproximadamente 2 a aproximadamente 25 % de O<sub>2</sub> en aire, preferiblemente a aproximadamente 5 a aproximadamente 20 % de O<sub>2</sub> en aire. Los citoblastos placentarios se cultivan preferiblemente a aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente a 37 °C. Los citoblastos placentarios se cultivan preferiblemente en una incubadora. El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo usando un biorreactor. Los citoblastos placentarios crecen preferiblemente a bajo estrés oxidativo (p. ej., con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína o similares).

- Una vez se obtiene un 70-90 % de confluencia, los citoblastos placentarios pueden someterse a pases. Por ejemplo, las células pueden tratarse enzimáticamente, p. ej., tripsinizarse, usando técnicas bien conocidas en la materia, para separarlas de la superficie de cultivo de tejido. Después de retirar los citoblastos placentarios por pipeteado y recontar las células, se someten a pases aproximadamente 20.000-100.000 citoblastos, preferiblemente aproximadamente 50.000 citoblastos placentarios, en un nuevo recipiente de cultivo que contiene medio de cultivo reciente. Típicamente, el medio nuevo es el mismo tipo de medio del que se retiraron los citoblastos. Se proporcionan en la presente memoria poblaciones de citoblastos placentarios que se han sometido a pases al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces o más, y combinaciones de los mismos.

**5.7 CONSERVACIÓN DE CITOBLASTOS PLACENTARIOS**

Los citoblastos placentarios pueden conservarse, es decir, disponerse en condiciones que permitan el almacenamiento a largo plazo, o condiciones que inhiban la muerte celular, p. ej. por apoptosis o necrosis.

- 50 Los citoblastos placentarios pueden conservarse usando, p. ej., una composición que comprende un inhibidor de la apoptosis, inhibidor de la necrosis y/o perfluorocarbono portador de oxígeno, como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. nº 2007/0190042.

- En una realización, se proporciona en la presente memoria un método de conservación de citoblastos placentarios que comprende poner en contacto dichos citoblastos placentarios con una composición de recogida de citoblastos placentarios que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono portador de 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 citoblastos placentarios, en comparación con un población de citoblastos placentarios no puesta en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de 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 proliferación de dichos citoblastos placentarios. En otra realización, dicha composición de recogida de citoblastos placentarios comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo portador de oxígeno en fases separadas. En otra realización, dicha composición de recogida de citoblastos comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo portador de oxígeno en una emulsión. En otra realización, la composición de recogida de citoblastos comprende adicionalmente un emulsionante, p. ej., lecitina. En otra realización, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo están a entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 25 °C en el momento de puesta en contacto con los citoblastos. En otra realización más específica, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo están a entre aproximadamente 2 °C y 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 5 °C, en el momento de puesta en contacto con los citoblastos. En otra realización más específica, dicha puesta en contacto se efectúa durante el transporte de dichos citoblastos placentarios. En otra realización más específica, dicha puesta en contacto se efectúa durante la congelación y descongelación de dicha población de citoblastos.

En otra realización, los citoblastos placentarios pueden conservarse mediante un método que comprende poner en contacto dichos citoblastos placentarios con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto conservante 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 de los citoblastos placentarios, en comparación con citoblastos placentarios no puestos en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, el compuesto conservante de órganos es una solución de UW (descrita en la patente de EE. UU. n° 4.798.824; también conocida como ViaSpan; véase también Southard et al., *Transplantation* 49(2): 251-257 (1990)) o una solución descrita en Stem et al., patente de EE. UU. n° 5.552.267. En otra realización, dicho compuesto conservante de órganos es hidroxietilalmidón, ácido lactobiónico, rafinosa o una combinación de los mismos.

En otra realización, los citoblastos placentarios para usar para producir citoblastos placentarios se ponen en contacto con una composición de recogida de citoblastos que comprende un inhibidor de la apoptosis y perfluorocarburo portador de oxígeno, compuesto conservante de órganos o una combinación de los mismos, durante la perfusión. En otra realización, dichos citoblastos placentarios para usar para producir citoblastos placentarios se ponen en contacto durante un proceso de disgregación de tejido, p. ej. digestión enzimática. En otra realización, se ponen en contacto las células placentarias con dicho compuesto de recogida de citoblastos después de la recogida por perfusión, o después de la recogida por disgregación de tejido, p. ej. digestión enzimática.

Típicamente, durante la recogida, enriquecimiento y aislamiento de citoblastos placentarios, es preferible minimizar o eliminar el estrés celular debido a hipoxia y estrés mecánico. En otra realización del método, por lo tanto, los citoblastos placentarios para usar para producir citoblastos placentarios se exponen a una condición hipóxica durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento durante menos de 6 horas durante dicha conservación, en la que una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración de oxígeno sanguíneo normal. En una realización más específica, dichos citoblastos placentarios se exponen a dicha condición hipóxica durante menos de 2 horas durante dicha conservación. En otra realización más específica, dichos citoblastos placentarios se exponen a dicha condición hipóxica durante menos de una hora, o menos de 30 minutos, o no se exponen a una condición hipóxica durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento. En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios no se exponen a estrés de cizalladura durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento.

Los citoblastos placentarios, así como los citoblastos placentarios para usar para producir citoblastos placentarios, descritos en la presente memoria pueden crioconservarse, p. ej., en medio de crioconservación en recipientes pequeños, p. ej., ampollas. El medio de crioconservación adecuado incluye, pero sin limitación medio de cultivo que incluye, p. ej., medio de crecimiento o medio de congelación celular, por ejemplo medio de congelación celular disponible comercialmente, p. ej., C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de crioconservación comprende preferiblemente DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración de, p. ej., aproximadamente un 10 % (v/v). El medio de crioconservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, Plasmalyte, metilcelulosa con o sin glicerol. Los citoblastos se enfrían preferiblemente a aproximadamente 1 °C/min durante la crioconservación. Es una temperatura de crioconservación preferida de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -180 °C, preferiblemente de aproximadamente -125 °C a aproximadamente -140 °C. Las células crioconservadas pueden transferirse a nitrógeno líquido antes de la descongelación para uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez las ampollas han alcanzado aproximadamente -90 °C, se transfieren a un área de almacenamiento en nitrógeno líquido. Las células crioconservadas se descongelan a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

## 5.8 USOS DE CÉLULAS PLACENTARIAS

### 5.8.1 Composiciones que comprenden células placentarias

Los métodos de tratamiento del dolor divulgados en la presente memoria pueden usarse composiciones que comprenden citoblastos placentarios, o biomoléculas de los mismos. De la misma manera, las poblaciones de citoblastos placentarios divulgadas en la presente memoria pueden combinarse con cualquier compuesto,

composición o dispositivo fisiológicamente aceptable o médicamente aceptable para uso, p. ej., en investigación o terapia.

#### 5.8.1.1 Células placentarias crioconservadas

5 Las células placentarias proporcionadas en la presente memoria pueden conservarse, por ejemplo crioconservarse, para uso posterior. Los métodos para la crioconservación de células, tales como citoblastos, son bien conocidos en la materia. Los citoblastos placentarios pueden prepararse en una forma que sea fácilmente administrable a un individuo. Por ejemplo, los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria pueden estar contenidos en un recipiente que sea adecuado para uso médico. Tal recipiente puede ser, por ejemplo, una bolsa, matraz, frasco, vial de plástico estéril u otro recipiente del que pueda dispensarse fácilmente la población de células placentarias. Por ejemplo, el  
10 recipiente puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico médicamente aceptable adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El recipiente es preferiblemente uno que permita la crioconservación de citoblastos placentarios.

15 Los citoblastos placentarios crioconservados pueden comprender citoblastos placentarios derivados de un único donante o de múltiples donantes. Los citoblastos placentarios pueden ser de HLA completamente coincidente con el receptor pretendido o de HLA parcial o completamente no coincidente.

Por tanto, en una realización, se proporciona en la presente memoria una composición que comprende citoblastos placentarios en un recipiente. En una realización específica, los citoblastos placentarios están, o se han, crioconservados. En otra realización específica, el recipiente es una bolsa, matraz, vial o frasco. En una realización  
20 más específica, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. En una realización más específica, dicha bolsa es adecuada para, permite o facilita la administración intravenosa de dichos citoblastos placentarios. La bolsa puede comprender múltiples cavidades o compartimentos que están interconectados para permitir el mezclado de los citoblastos placentarios y una o más de otras soluciones, p. ej., un fármaco, antes o durante la administración. En otra realización específica, la composición comprende uno o más compuestos que facilitan la crioconservación de la población de citoblastos combinada. En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios están contenidos  
25 en una solución acuosa fisiológicamente aceptable. En una realización más específica, dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable es solución de NaCl al 0,9 %. En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios son de HLA coincidente con el receptor de dichos citoblastos placentarios. En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios son de HLA al menos parcialmente no coincidente con el receptor de dichos citoblastos placentarios. En otra realización específica, dichos citoblastos placentarios son de una pluralidad de donantes.

#### 30 5.8.1.2 Composiciones farmacéuticas

Las poblaciones de citoblastos placentarios aislados, o poblaciones de células que comprenden los citoblastos placentarios aislados, pueden formularse en composiciones farmacéuticas para uso *in vivo*, p. ej., en los métodos de tratamiento proporcionados en la presente memoria. Tales composiciones farmacéuticas comprenden citoblastos placentarios, o una población de células que comprende citoblastos placentarios aislados, en un portador farmacéuticamente aceptable, p. ej., una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptada para administración  
35 *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los citoblastos placentarios aislados descritos en la presente memoria pueden comprender cualquiera, o cualquier combinación, de las poblaciones de citoblastos placentarios aislados, o citoblastos placentarios aislados, descritos en otro lugar de la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células aisladas fetales, maternas o tanto fetales como maternas.  
40 Las composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente memoria pueden comprender además citoblastos placentarios aislados obtenidos de un único individuo, cordón umbilical o placenta, o de una pluralidad de individuos, cordones umbilicales o placentas. Cualquiera de los citoblastos placentarios, descritos en otro lugar de la presente memoria, puede formularse en una composición farmacéutica como se describe a continuación.

45 Las composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente memoria pueden comprender cualquier número de citoblastos placentarios aislados. Por ejemplo, una única dosis unitaria de citoblastos placentarios aislados puede comprender aproximadamente al menos, o no más, de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $3,5 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $4,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5,5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $6,5 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $8,5 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $9,5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más células aisladas. En ciertos aspectos, una única dosis unitaria de citoblastos placentarios aislados puede comprender aproximadamente al menos, o no más de,  
50  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^6$ , de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$ , de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$ , de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$ , de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$ , de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$ , de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$ , de aproximadamente  $1 \times 10^9$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$ , o de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  citoblastos placentarios. En aspectos particulares, los citoblastos placentarios están  
55 presentes en una composición farmacéutica adecuada para administración sistémica, p. ej. intravenosa (IV). En otros aspectos particulares, los citoblastos placentarios están presentes en una composición farmacéutica adecuada para administración local.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una única o múltiples dosis unitarias de citoblastos placentarios aislados pueden administrarse en conexión con los métodos descritos en la presente memoria. En un aspecto, la

administración puede comprender la administración de una única dosis unitaria de citoblastos placentarios. En otro aspecto, la administración puede comprender la administración de múltiples dosis unitarias de citoblastos placentarios. La administración puede conseguirse mediante, por ejemplo, inyecciones individuales o múltiples, p. ej., 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 inyecciones locales o sistémicas.

5 Las composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente memoria comprenden poblaciones de células que comprenden un 50 % de células viables o más (es decir, al menos un 50 % de las células en la población son funcionales o vivas). Preferiblemente, al menos un 60 % de las células en la población son viables. Más preferiblemente, al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células en la población de la composición farmacéutica son viables.

10 Las composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente memoria pueden comprender uno o más compuestos que, p. ej., facilitan el injerto (p. ej., anticuerpos anti-receptor de linfocitos T, un inmunosupresor o similares); estabilizantes tales como albúmina, dextrano 40, gelatina, hidroxietilalmidón, plasmalyte y similares.

15 Cuando se formula como solución inyectable, en un aspecto, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 1 % a 1,5 % de HSA y aproximadamente un 2,5 % de dextrano. En un aspecto preferido, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 5 x 10<sup>6</sup> células por mililitro a aproximadamente 2 x 10<sup>7</sup> células por mililitro en una solución que comprende 5 % de HSA y 10 % de dextrano, opcionalmente que comprende un inmunosupresor, p. ej., ciclosporina A a, p. ej., 10 mg/kg.

20 En otros aspectos, la composición farmacéutica, p. ej., una solución, comprende una pluralidad de células, p. ej., citoblastos placentarios aislados, en la que dicha composición farmacéutica comprende entre aproximadamente 1,0 ± 0,3 x 10<sup>6</sup> células por mililitro a aproximadamente 5,0 ± 1,5 x 10<sup>6</sup> células por mililitro. En otros aspectos, la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente 1,5 x 10<sup>6</sup> células por mililitro a aproximadamente 3,75 x 10<sup>6</sup> células por mililitro. En otros aspectos, la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células/ml a aproximadamente 50 x 10<sup>6</sup> células/ml, de aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células/ml a aproximadamente 40 x 10<sup>6</sup> células/ml, de aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células/ml a aproximadamente 30 x 10<sup>6</sup> células/ml, de aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células/ml a aproximadamente 20 x 10<sup>6</sup> células/ml, de aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células/ml a aproximadamente 15 x 10<sup>6</sup> células/ml, o de aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células/ml a aproximadamente 10 x 10<sup>6</sup> células/ml. En ciertos aspectos, la composición farmacéutica no comprende agregaciones celulares visibles (concretamente, sin agregados macrocelulares) o sustancialmente ninguno de tales agregados visibles. Como se usa en la presente memoria, "agregados macrocelulares" significa una agregación de células visible sin ampliación, p. ej. visible a simple vista, y en general hace referencia a una agregación celular de más de aproximadamente 150 micrómetros. En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende aproximadamente un 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 %, 5,0 %, 5,5 %, 6,0 %, 6,5 %, 7,0 %, 7,5 %, 8,0 %, 8,5 %, 9,0 %, 9,5 % o 10 % de dextrano, p. ej., dextrano 40. En un aspecto específico, dicha composición comprende de aproximadamente 7,5 % a aproximadamente 9 % de dextrano 40. En un aspecto específico, dicha composición comprende aproximadamente un 5,5 % de dextrano 40. En ciertos aspectos, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 % de seroalbúmina humana (HSA). En aspectos específicos, la composición farmacéutica comprende aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o 15 % de HSA. En un aspecto específico, dichas células se han crioconservado y descongelado. En otro aspecto específico, dichas células se han filtrado a través de un filtro de 70 µM a 100 µM. En otro aspecto específico, dicha composición no comprende agregados celulares visibles. En otro aspecto específico, dicha composición comprende menos de aproximadamente 200 agregados celulares por 10<sup>6</sup> células, en la que dichos agregados celulares son visibles solo al microscopio, p. ej., un microscopio óptico. En otro aspecto específico, dicha composición comprende menos de aproximadamente 150 agregados celulares por 10<sup>6</sup> células, en el que dichos agregados celulares son visibles solo al microscopio, p. ej., un microscopio óptico. En otro aspecto específico, dicha composición comprende menos de aproximadamente 100 agregados celulares por 10<sup>6</sup> células, en el que dichos agregados celulares son visibles solo al microscopio, p. ej., un microscopio óptico.

En un aspecto específico, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 1,0 ± 0,3 x 10<sup>6</sup> células por mililitro, aproximadamente un 5,5 % de dextrano 40 (p/v), aproximadamente un 10 % de HSA (p/v) y aproximadamente un 5 % de DMSO (v/v).

50 En otros aspectos, la composición farmacéutica comprende una pluralidad de células, p. ej., una pluralidad de citoblastos placentarios aislados en una solución que comprende un 10 % de dextrano 40, en la que la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente 1,0 ± 0,3 x 10<sup>6</sup> células por mililitro a aproximadamente 5,0 ± 1,5 x 10<sup>6</sup> células por mililitro, y en la que dicha composición no comprende agregados celulares visibles a simple vista (concretamente, no comprende agregados macrocelulares). En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente 1,5 x 10<sup>6</sup> células por mililitro a aproximadamente 3,75 x 10<sup>6</sup> células por mililitro.

55 En un aspecto específico, dichas células se han crioconservado y descongelado. En otro aspecto específico, dichas células se han filtrado a través de un filtro de 70 µM a 100 µM. En otro aspecto específico, dicha composición comprende menos de aproximadamente 200 agregados microcelulares (es decir, agregados celulares visibles solo con ampliación) por 10<sup>6</sup> células. En otro aspecto específico, la composición farmacéutica comprende menos de aproximadamente 150 agregados microcelulares por 10<sup>6</sup> células. En otro aspecto específico, la composición farmacéutica comprende menos de aproximadamente 100 agregados microcelulares por 10<sup>6</sup> células. En otro aspecto

específico, la composición farmacéutica comprende menos de un 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, o 2 % de DMSO, o menos de un 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o 0,1 % de DMSO.

5 Se divulgan además en la presente memoria composiciones que comprenden células, en las que dichas composiciones se producen mediante uno de los métodos divulgados en la presente memoria. Por ejemplo, en un aspecto, la composición farmacéutica comprende células, en la que la composición farmacéutica se produce mediante un método que comprende filtrar una solución que comprende citoblastos placentarios formando una solución que contiene células filtrada; diluir la solución que contiene células filtrada con una primera solución a aproximadamente 1 a  $50 \times 10^6$ , 1 a  $40 \times 10^6$ , 1 a  $30 \times 10^6$ , 1 a  $20 \times 10^6$ , 1 a  $15 \times 10^6$  o 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro, p. ej., antes de crioconservación; y diluir la solución que contiene células filtrada resultante con una segunda solución que comprende dextrano, pero que no comprende seroalbúmina humana (HSA), produciendo dicha composición. En ciertos aspectos, dicha dilución es de no más de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertos aspectos, dicha dilución es de no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertos aspectos, dicha dilución es de no más de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertos otros aspectos, si la solución que contiene células filtrada antes de la dilución comprende menos de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células por mililitro, la filtración es opcional. En ciertos otros aspectos, si la solución que contiene células filtrada antes de la dilución comprende menos de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, la filtración es opcional. En ciertos otros aspectos, si la solución que contiene células filtrada antes de la dilución comprende menos de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro, la filtración es opcional.

20 En un aspecto específico, las células se crioconservan entre dicha dilución con una primera solución de dilución y dicha dilución con dicha segunda solución de dilución. En otro aspecto específico, la primera solución de dilución comprende dextrano y HSA. El dextrano en la primera solución de dilución o segunda solución de dilución puede ser dextrano de cualquier peso molecular, p. ej., dextrano que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 150 kDa. En algunos aspectos, dicho dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución es dextrano aproximadamente al 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 %, 5,0 %, 5,5 %, 6,0 %, 6,5 %, 7,0 %, 7,5 %, 8,0 %, 8,5 %, 9,0 %, 9,5 % o 10 %. En otro aspecto específico, el dextrano en dicha primera solución de dilución o dicha segunda solución de dilución es dextrano 40. En otro aspecto específico, el dextrano en dicha primera solución de dilución y dicha segunda solución de solución es dextrano 40. En otro aspecto específico, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 al 5,0 %. En otro aspecto específico, dicho dextrano 40 en dicha primera solución de dilución es dextrano 40 al 5,5 %. En otro aspecto específico, dicho dextrano 40 en dicha segunda solución de dilución es dextrano 40 al 10 %. En otro aspecto específico, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA de 1 a 15 %. En otro aspecto, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA aproximadamente al 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o 15 %. En otro aspecto específico, dicha HSA en dicha solución que comprende HSA es HSA al 10 %. En otro aspecto específico, dicha primera solución de dilución comprende HSA. En un aspecto más específico, dicha HSA en dicha primera solución de dilución es HSA al 10 %. En otro aspecto específico, dicha primera solución de dilución comprende un crioprotector. En un aspecto más específico, dicho crioprotector es DMSO. En otro aspecto específico, dicho dextrano 40 en dicha segunda solución de dilución es dextrano 40 aproximadamente al 10 %. En otro aspecto específico, dicha composición que comprende células comprende dextrano de aproximadamente un 7,5 % a aproximadamente un 9 %.

40 En otro aspecto específico, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente  $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$  células por mililitro a aproximadamente  $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$  células por mililitro. En otro aspecto específico, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células por mililitro a aproximadamente  $3,75 \times 10^6$  células por mililitro.

45 En otro aspecto, la composición farmacéutica se elabora mediante un método que comprende (a) filtrar una solución que contiene células que comprende citoblastos placentarios antes de crioconservación, produciendo una solución que contiene células filtrada; (b) crioconservar las células en la solución que contiene células filtrada a aproximadamente 1 a  $50 \times 10^6$ , 1 a  $40 \times 10^6$ , 1 a  $30 \times 10^6$ , 1 a  $20 \times 10^6$ , 1 a  $15 \times 10^6$  o 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro; (c) descongelar las células y (d) diluir la solución que contiene células filtrada de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:11 (v/v) con una solución de dextrano 40. En ciertos aspectos, si el número de células es menor de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro antes de la etapa (a), la filtración es opcional. En un aspecto más específico, las células de la etapa (b) se crioconservan a aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. En un aspecto más específico, las células de la etapa (b) se crioconservan en una solución que comprende de aproximadamente 5 % a aproximadamente 10 % de dextrano 40 y HSA. En ciertos aspectos, dicha dilución en la etapa (b) es de no más de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células por mililitro.

55 En otro aspecto, la composición farmacéutica se elabora mediante un método que comprende: (a) suspender PDAC™ en una solución de dextrano 40 al 5,5 % que comprende HSA al 10 %, formando una solución que contiene células; (b) filtrar la solución que contiene células a través de un filtro de 70  $\mu\text{m}$ ; (c) diluir la solución que contiene células con una solución que comprende dextrano 40 al 5,5 %, HSA al 10 % y DMSO al 5 % a aproximadamente 1 a  $50 \times 10^6$ , 1 a  $40 \times 10^6$ , 1 a  $30 \times 10^6$ , 1 a  $20 \times 10^6$ , 1 a  $15 \times 10^6$ , o 1 to  $10 \times 10^6$  células por mililitro; (d) crioconservar las células; (e) descongelar las células y (f) diluir la solución que contiene células 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano 40 al 10 %. En ciertos aspectos, dicha dilución de la etapa (c) es a no más de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células por mililitro. En ciertos aspectos, dicha dilución de la etapa (c) es a no más de aproximadamente  $10 \pm 3 \times 10^6$  células/ml. En ciertos aspectos, dicha dilución de la etapa (c) es a no más de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células/ml.

En otro aspecto, la composición que comprende células se elabora mediante un método que comprende: (a) centrifugar una pluralidad de citoblastos placentarios, recogiendo las células; (b) resuspender las células en dextrano 40 al 5,5 %; (c) centrifugar las células para recoger las células; (d) resuspender las células en una solución de dextrano 40 al 5,5 % que comprende HSA al 10 %; (e) filtrar las células a través de un filtro de 70  $\mu$ M; (f) diluir las células en dextrano 40 al 5,5 %, HSA al 10 % y DMSO al 5 % a aproximadamente 1 a 50 x 10<sup>6</sup>, 1 a 40 x 10<sup>6</sup>, 1 a 30 x 10<sup>6</sup>, 1 a 20 x 10<sup>6</sup>, 1 a 15 x 10<sup>6</sup> o 1 a 10 x 10<sup>6</sup> células por mililitro; (g) crioconservar las células; (h) descongelar las células y (i) diluir las células 1:1 a 1:11 (v/v) con dextrano 40 a un 10 %. En ciertos aspectos, dicha dilución de la etapa (f) es a no más de aproximadamente 15 x 10<sup>6</sup> células por mililitro. En ciertos aspectos, dicha dilución de la etapa (f) es a no más de aproximadamente 10  $\pm$  3 x 10<sup>6</sup> células/ml. En ciertos aspectos, dicha etapa de dilución de la etapa (f) es a no más de aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml. En otros aspectos, si el número de células es menor de aproximadamente 10  $\pm$  3 x 10<sup>6</sup> células por mililitro, la filtración es opcional.

Las composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas que comprenden las células placentarias aisladas, descritas en la presente memoria pueden comprender cualquiera de los citoblastos placentarios aislados descritos en la presente memoria.

15 Pueden usarse otras formulaciones inyectables adecuadas para la administración de productos celulares.

En ciertos aspectos, los citoblastos placentarios pueden encapsularse, p. ej., en alginato, antes o después de la crioconservación. En ciertos otros aspectos, los citoblastos placentarios pueden combinarse con plasma rico en plaquetas, p. ej., para inyección local o aplicaciones de administración local. En aspectos específicos, el plasma rico en plaquetas es plasma rico en plaquetas autólogo, p. ej., autólogo del individuo que tiene dolor al que se administran los citoblastos placentarios. En otros aspectos específicos, el plasma rico en plaquetas es alogénico del individuo que tiene dolor al que se administran los citoblastos placentarios. En otro aspecto específico, dicho plasma rico en plaquetas deriva de perfusato placentario. En otros aspectos específicos, la relación de volumen a volumen de citoblastos placentarios a plasma rico en plaquetas en la composición, o la relación entre los números de citoblastos placentarios y los números de plaquetas está entre aproximadamente 10:1 y 1:10; entre aproximadamente 100: 1 y 1:100; o es de aproximadamente 1:1.

En un aspecto, la composición farmacéutica comprende células placentarias aisladas o PDAC<sup>TM</sup> que son sustancial o completamente de origen no materno, es decir, tienen el genotipo fetal; p. ej., al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o aproximadamente un 100 % son de origen no materno.

30 En un aspecto específico, la composición farmacéutica comprende adicionalmente citoblastos que no se obtienen a partir de una placenta.

Los citoblastos placentarios aislados de las composiciones, p. ej. composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente memoria, pueden comprender citoblastos placentarios derivados de un único donante o de múltiples donantes. Las células placentarias aisladas pueden ser de HLA completamente coincidente con el receptor pretendido o de HLA parcial o completamente no coincidente.

## 35 **5.9 MEDIOS ACONDICIONADOS PARA CITOBLASTOS PLACENTARIOS**

Los citoblastos placentarios (incluyendo citoblastos de cordón umbilical) divulgados en la presente memoria pueden usarse para producir medio acondicionado, p. ej., para el tratamiento de un individuo que tiene dolor o la mejora de dolor en un individuo. En diversos aspectos, el medio acondicionado comprende medio en que los citoblastos placentarios han crecido durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días. En otros aspectos, el medio acondicionado comprende medio en que los citoblastos placentarios han crecido hasta al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de confluencia, o hasta un 100 % de confluencia. En otro aspecto, el medio acondicionado comprende medio en que se han cultivado citoblastos placentarios y citoblastos no placentarios no de cordón umbilical.

## 45 **5.10 MATRICES QUE COMPREDEN CÉLULAS PLACENTARIAS**

Se divulgan además en la presente memoria matrices, hidrogeles, armazones y similares que comprenden citoblastos placentarios. Los citoblastos placentarios divulgados en la presente memoria pueden sembrarse sobre una matriz natural, p. ej., un biomaterial placentario tal como un material de membrana amniótica. Tal material de membrana amniótica puede ser, p. ej., membrana amniótica extirpada directamente de una placenta de mamífero; membrana amniótica fijada o tratada térmicamente sustancialmente seca (concretamente, < 20 % de H<sub>2</sub>O), membrana coriónica, membrana coriónica sustancialmente seca, membrana amniótica y coriónica sustancialmente seca y similares. Los biomateriales placentarios preferidos sobre los que pueden sembrarse citoblastos placentarios se describen en Hariri, publicación de solicitud de EE. UU. n° 2004/0048796.

Las células placentarias divulgadas en la presente memoria pueden suspenderse en una solución de hidrogel adecuada, p. ej., para inyección. Los hidrogeles adecuados para tales composiciones incluyen péptidos autoensamblantes tales como RAD16. Los citoblastos placentarios pueden combinarse también, p. ej., con alginato o plasma rico en plaquetas u otras matrices que contienen fibrina, para inyección local. En un aspecto, puede permitirse

- endurecer una solución de hidrogel que comprende citoblastos placentarios, por ejemplo en un molde, formando una matriz que tiene las células dispersadas en la misma para implantación. Los citoblastos placentarios en tal matriz pueden cultivarse también de modo que las células se expandan mitóticamente antes de la implantación. El hidrogel puede ser, p. ej., un polímero orgánico (natural o sintético) que está reticulado por enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura de red abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua formando un gel.
- 5 Los materiales formadores de hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazinas y poliácridatos que se reticularon iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-polipropilenglicol que se reticularon por temperatura o pH, respectivamente. En algunos aspectos, el hidrogel o matriz es biodegradable.
- 10 En algunos aspectos, la matriz comprende un gel polimerizable *in situ* (véanse, p. ej., la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2002/0022676; Anseth et al., *J Control Release*, 78(1-3): 199-209 (2002); Wang et al., *Biomaterials*, 24(22): 3969-80 (2003).
- En algunos aspectos, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas o soluciones alcohólicas acuosas que tienen grupos laterales cargados o una sal iónica monovalente de los mismos. Los ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que pueden hacerse reaccionar con cationes son poli(fosfacenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados tales como poliestireno sulfonado. Pueden usarse también copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de viniléter. Son ejemplos de grupos ácidos grupos ácido carboxílico, grupos ácido sulfónico, grupos alcohol halogenados (preferiblemente fluorados), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.
- 15 20 Los citoblastos placentarios pueden sembrarse sobre un marco o armazón tridimensional e implantarse *in vivo*. Tal marco puede implantarse en combinación con uno cualquiera o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que estimulen la formación de tejido o potencien o mejoren de otro modo la práctica de los métodos de tratamiento descritos en otro lugar de la presente memoria.
- 25 Los ejemplos de armazones que pueden usarse en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria incluyen esteras no tejidas, espumas porosas o péptidos autoensamblantes. Las esteras no tejidas pueden formarse usando fibras que comprenden un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (p. ej., PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Pueden usarse también como armazones espumas compuestas, p. ej., por copolímero de poli( $\epsilon$ -caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas mediante procesos tales como criodesecación o liofilización (véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 6.355.699).
- 30 En otro aspecto, el armazón es, o comprende, un armazón nanofibroso, p. ej., un armazón nanofibroso electrohilado. En un aspecto más específico, dicho armazón nanofibroso comprende poli(ácido L-láctico) (PLLA), colágeno de tipo I, un copolímero de fluoruro de vinilideno y trifluoroetileno (PVDF-TrFE), poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(L-lactida-co- $\epsilon$ -caprolactona) [P(LLA-CL)] (p. ej., 75:25), y/o un copolímero de poli-(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) y colágeno de tipo I. Son conocidos en la materia métodos de producción de armazones nanofibrosos, p. ej., armazones nanofibrosos electrohilados. Véanse, p. ej., Xu et al., *Tissue Engineering* 10(7): 1160-1168 (2004); Xu et al., *Biomaterials* 25: 877-886 (2004); Meng et al., *J Biomaterials Sci., Polymer Edition* 18(1): 81-94 (2007).
- 35 Los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria pueden sembrarse también sobre, o ponerse en contacto con, un material cerámico fisiológicamente aceptable incluyendo, pero sin limitación, fosfato de monocalcio, dicalcio, tricalcio, alfa-tricalcio, beta-tricalcio y tetracalcio, hidroxapatito, fluoroapatitos, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de magnesio y calcio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS®, y mezclas de los mismos. Los materiales cerámicos biocompatibles porosos comercialmente disponibles incluyen SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canadá), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Suiza), y productos de injerto óseo de colágeno mineralizado tales como HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITROSS®, RHAKOSS™ y CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). Los marcos pueden ser una mezcla, combinación o mezcla combinada de materiales naturales y/o sintéticos.
- 40 45 En otro aspecto, los citoblastos placentarios pueden sembrarse sobre, o ponerse en contacto con, un fieltro que, p. ej., puede estar compuesto por un hilo multifilamento a base de un material bioabsorbible tal como copolímeros o combinaciones de PGA, PLA, PCL, o ácido hialurónico.
- 50 Los citoblastos placentarios descritos en la presente memoria pueden sembrarse, en otro aspecto, sobre armazones de espuma que pueden ser estructuras de mezcla combinada. Tales armazones de espuma pueden moldearse con una forma útil. En algunos aspectos, el marco se trata, p. ej., con ácido acético 0,1 M seguido de incubación en polilisina, PS y/o colágeno antes de la inoculación de las células placentarias para potenciar la adherencia celular. Las superficies externas de una matriz pueden modificarse para mejorar la adherencia o el crecimiento de células y la diferenciación del tejido, tal como por recubrimiento plasmático de la matriz o adición de una o más proteínas (p. ej., colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (p. ej., sulfato de heparina, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, etc.), una matriz celular y/u otros materiales tales como, pero sin limitación, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales y similares.
- 55

En algunos aspectos, el armazón comprende, o se trata con, materiales que lo vuelve no trombogénico. Estos tratamientos y materiales pueden promover y mantener también el crecimiento endotelial, la migración y deposición de matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero sin limitación, materiales naturales tales como proteínas de membrana basal tales como laminina y colágeno de tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE y poliuretanosiliconas segmentadas tales como PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). El armazón puede comprender también agentes antitrombóticos tales como heparina; los armazones pueden tratarse también para alterar la carga superficial (p. ej., recubrimiento con plasma) antes de sembrar con citoblastos placentarios.

#### 5.10.1 Citoblastos placentarios modificados genéticamente

En otro aspecto, se divulgan células placentarias que son modificadas genéticamente, p. ej., para producir un ácido nucleico o polipéptido de interés. La modificación genética puede lograrse, p. ej., usando vectores basados en virus incluyendo, pero sin limitación, vectores replicantes no integrantes, p. ej., vectores de papilomavirus, vectores de SV40, vectores adenovíricos; vectores víricos integrantes, p. ej., vector retrovírico o vectores víricos adenoasociados o vectores víricos defectivos de replicación. Otros métodos de introducción de ADN en células incluyen el uso de liposomas, electroporación, pistola génica, inyección directa de ADN o similares.

Los citoblastos pueden, p. ej., transformarse o transfectarse con ADN controlado por o en asociación operativa con uno o más elementos de control de expresión apropiados, por ejemplo secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación y sitios de entrada interna al ribosoma. Preferiblemente, tal ADN incorpora un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, los citoblastos genomanipulados pueden, p. ej., crecer en medios enriquecidos y cambiarse entonces a medios selectivos. En un aspecto, el ADN usado para genomanipular una célula placentaria comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de interés, p. ej., una citocina, factor de crecimiento, agente de diferenciación o polipéptido terapéutico.

El ADN usado para genomanipular el citoblasto puede comprender cualquier promotor conocido en la materia por impulsar la expresión de una secuencia nucleotídica en células de mamífero, p. ej. células humanas. Por ejemplo, los promotores pueden incluir, pero sin limitación, el promotor/potenciador de CMV, el promotor de SV40, el promotor de papilomavirus, el promotor del virus de Epstein-Barr, el promotor del gen de elastina y similares. En un aspecto específico, el promotor es regulable de modo que la secuencia nucleotídica se exprese solo cuando se desee. Los promotores pueden ser inducibles (p. ej., aquellos asociados con metalotioneína y proteínas de choque térmico) o constitutivos.

En otro aspecto específico, el promotor es específico de tejido o exhibe especificidad de tejido. Los ejemplos de tales promotores incluyen, pero sin limitación: la región de control del gen de proteína básica de mielina (Readhead et al., 1987, *Cell* 48: 703) (células oligodendrocíticas); la región de control del gen de elastasa I (Swit et al., 1984, *Cell* 38: 639; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7: 425) (células pancreáticas acinares); la región de control del gen de insulina (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115) (células beta pancreáticas) y la región de control del gen de cadena ligera 2 de miosina (Shani, 1985, *Nature* 314: 283) (músculo esquelético).

Las células placentarias pueden genomanipularse para “desactivación génica” o “atenuación génica” de la expresión de uno o más genes. La expresión de un gen nativo de una célula puede disminuirse, por ejemplo, por inhibición de la expresión al inactivar el gen completamente, p. ej., por recombinación homóloga. En un aspecto, por ejemplo, se interrumpe un exón que codifica una región importante de la proteína, o un exón en 5' de esa región, por un marcador seleccionable positivo, p. ej., neo, que previene la producción de ARNm normal del gen diana y da como resultado la inactivación del gen. Un gen puede inactivarse también creando una deleción en parte de un gen o eliminando el gen entero. Al usar un constructo con dos regiones de homología con el gen diana que están alejadas en el genoma, pueden eliminarse las secuencias intermedias de las dos regiones (Mombaerts et al., 1991, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 3084). Pueden usarse también moléculas antisentido, ADNzimas, ARN interferente pequeño y moléculas de ribozima que inhiban la expresión del gen diana para reducir el nivel de actividad del gen diana en los citoblastos. Por ejemplo, las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de genes complejos mayores de histocompatibilidad (HLA) han mostrado ser las más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Las moléculas de triple hélice pueden utilizarse para reducir el nivel de actividad del gen diana. Véase, p. ej., L. G. Davis et al. (eds), 1994, *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn.

En un aspecto específico, las células placentarias pueden modificarse genéticamente con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de interés, en las que la expresión de polipéptido de interés es controlable por un factor exógeno, p. ej. polipéptido, molécula orgánica pequeña o similares. Tal polipéptido puede ser un polipéptido terapéutico. En un aspecto más específico, el polipéptido de interés es IL-12 o antagonista de receptor de interleucina 1 (IL-1Ra). En otro aspecto más específico, el polipéptido de interés es una fusión de antagonista de receptor de interleucina 1 y dihidrofolato reductasa (DHFR), y el factor exógeno es un antifolato, p. ej. metotrexato. Tal constructo es útil en la genomanipulación de células placentarias que expresan IL-1Ra, o una fusión de IL-1Ra y DHFR, tras contacto con metotrexato. Tal constructo puede usarse, p. ej., en el tratamiento de artritis reumatoide. En este aspecto, la fusión de IL-1Ra y DHFR se regula positivamente por traducción tras exposición a un antifolato tal como metotrexato. Por lo tanto, en otro aspecto específico, el ácido nucleico usado

para genomanipular una célula placentaria puede comprender secuencias nucleotídicas que codifican un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que dichos primer y segundo polipéptidos se expresan como una proteína de fusión que se regula positivamente por traducción en presencia de un factor exógeno. El polipéptido puede expresarse transitoriamente o a largo plazo (p. ej., durante el transcurso de semanas o meses).

- 5 Tal molécula de ácido nucleico puede comprender adicionalmente una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que permite la selección positiva de citoblastos genomanipulados, o permite la visualización de los citoblastos genomanipulados. En otro aspecto más específico, la secuencia nucleotídica codifica un polipéptido que es, p. ej., fluorescente en condiciones de visualización apropiadas, p. ej., luciferasa (Luc). En un aspecto más específico, tal molécula de ácido nucleico puede comprender IL-1Ra-DHFR-IRES-Luc, donde IRES es un sitio interno de entrada a ribosoma.

### 5.10.2 Estirpes de citoblastos placentarias inmortalizadas

- 15 Los citoblastos placentarios pueden inmortalizarse condicionalmente por transfección con un vector que contiene un gen promotor del crecimiento, es decir, un gen que codifica una proteína que, en condiciones apropiadas, promueve el crecimiento de los citoblastos placentarios, de tal modo que la producción y/o actividad de la proteína promotora del crecimiento sea regulable por un factor externo. En una realización preferida, el gen promotor del crecimiento es un oncogén tal como, pero sin limitación, v-myc, N-myc, c-myc, p53, antígeno T grande de SV40, antígeno T grande de polioma, E1a de adenovirus o proteína E7 de papilomavirus humano.

- 20 La regulación externa de la proteína promotora del crecimiento puede conseguirse disponiendo el gen promotor del crecimiento bajo el control de un promotor regulable externamente, p. ej. un promotor cuya actividad pueda controlarse, por ejemplo, poniendo en contacto las células con un compuesto al que sea sensible el promotor. En una realización, 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 de citomegalovirus humano fusionado con secuencias operadoras de tet. tTA es una proteína de fusión del represor (tetR) del operón de resistencia a tet derivado del transposón 10 de *Escherichia coli* y del dominio ácido de VP16 de herpesvirus simple. Las concentraciones bajas no tóxicas de tet (p. ej., 0,01-1,0 µg/ml) anulan casi completamente la transactivación por tTA.

- 30 En una realización, el vector contiene además un gen que codifica un marcador seleccionable, p. ej. una proteína que confiere resistencia a fármacos. El gen bacteriano de resistencia a neomicina ( $neo^R$ ) es uno de tales marcadores que puede emplearse en los métodos descritos en la presente memoria. Las células portadoras de  $neo^R$  pueden seleccionarse por medios conocidos por los especialistas en la materia, tales como la adición, p. ej., de G418 100-200 µg/ml al medio de crecimiento.

- 35 La transfección puede conseguirse mediante cualquiera de una variedad de medios conocidos por los especialistas en la materia incluyendo, pero sin limitación, infección retroviral. En general, puede transfectarse un cultivo celular por incubación con una mezcla de medio acondicionado recogida de la estirpe celular productora del vector de DMEM/F12 que contiene suplementos de N2. Por ejemplo, un cultivo de células placentarias preparado como se describe anteriormente puede infectarse, p. ej., después de 5 días *in vitro* por incubación durante aproximadamente 20 horas en un volumen de medio acondicionado y dos volúmenes de DMEM/F12 que contiene suplementos de N2. Las células transfectadas portadoras de un marcador seleccionable pueden seleccionarse entonces como se describe anteriormente.

- 45 Después de la transfección, se someten a pases los cultivos sobre una superficie que permita la proliferación, p. ej. que permita duplicar al menos un 30 % de las células en un periodo de 24 horas. Preferiblemente, el sustrato es un sustrato de poliornitina/laminina consistente en plástico de cultivo de tejido recubierto con poliornitina (10 µg/ml) y/o laminina (10 µg/ml), un sustrato de polilisina/laminina o una superficie tratada con fibronectina. Los cultivos se alimentan entonces cada 3-4 días con medio de crecimiento, que puede estar suplementado o no con uno o más factores potenciadores de la proliferación. Los factores potenciadores de la proliferación pueden añadirse al medio de crecimiento cuando los cultivos son menos de un 50 % confluentes.

- 50 Las estirpes de citoblastos placentarios inmortalizadas condicionalmente pueden someterse a pases usando técnicas estándares, tales como por tripsinación, cuando están 80-95 % confluentes. Hasta aproximadamente el 20º pase, en algunas realizaciones, es beneficioso mantener la selección (por ejemplo, mediante la adición de G418 para células que contienen el gen de resistencia a neomicina). Las células pueden también congelarse en nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo.

- 55 Las estirpes celulares clonales pueden aislarse de una estirpe de citoblastos placentarios humanos inmortalizada condicionalmente preparada como se describe anteriormente. En general, tales estirpes celulares clonales pueden aislarse usando técnicas estándares, tales como por dilución limitada o usando anillos de clonación, y expandirse. Las estirpes celulares clonales pueden alimentarse en general y someterse a pases como se describe anteriormente.

Las estirpes de citoblastos placentarios humanos inmortalizadas condicionalmente que pueden, pero no tienen que

ser clonales, pueden inducirse en general a diferenciar suprimiendo la producción y/o actividad de la proteína promotora del crecimiento bajo condiciones de cultivo que faciliten 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, p. ej. temperatura o composición del medio, pueden modificarse para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. Para el sistema de expresión génica controlado por tetraciclina discutido anteriormente, la diferenciación puede conseguirse mediante la adición de tetraciclina para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. En general, 1 µg/ml de tetraciclina durante 4-5 días es suficiente para iniciar la diferenciación. Para promover adicionalmente la diferenciación, pueden incluirse agentes adicionales en el medio de crecimiento.

**6. EJEMPLOS**

**6.1 EJEMPLO 1: TRATAMIENTO EXITOSO DE DOLOR NEUROPÁTICO USANDO CITOBLASTOS PLACENTARIOS**

Este ejemplo demuestra que los citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PDAC™) son eficaces para reducir el dolor neuropático.

Se usó un modelo de dolor neuropático en rata. Se dividieron ratas Sprague Dawley macho, de 175-200 g de peso, en tres grupos de animales experimentales, que recibieron 1 x 10<sup>6</sup>, 3 x 10<sup>6</sup> o 1 x 10<sup>7</sup> PDAC™ por vía intravenosa. Los animales de control negativo recibieron solo vehículo. Los animales de control positivo recibieron gabapentina 50 mg/kg o 100 mg/kg (un analgésico) el día 11, 14, 18, 21, 25, 28 y 35 después de la cirugía.

Procedimiento quirúrgico: El día 0 (D0), se indujo anestesia por inyección IP de mezcla de ketamina (85 mg/kg)/xilazina (5 mg/kg). Se separaron los músculos paraespinales izquierdos de las ratas de las apófisis espinosas de L4 a S2. Se retiró cuidadosamente la apófisis transversal L6 con unas pinzas de osteotomía para identificar visualmente los nervios espinales L4-L6. Se aislaron los nervios espinales izquierdos L5 y L6 y se ligaron estrechamente con hilo de seda 5-0. Se permitieron recuperar entonces los animales.

El D7, se valoró la sensibilidad al dolor de todos los grupos como valor basal. Se valoró de nuevo la sensibilidad al dolor para todos los animales a D11, D14, D18, D21, D25, D28 y D35.

Antes del procedimiento causante de dolor, se dispuso en D-1 cada rata dentro de una cámara de Plexiglas durante un periodo de aclimatación de 10-15 minutos. Se evaluó la sensibilidad de las ratas a una variedad de filamentos de von Frey en el intervalo del filamento más fino de 8 g al filamento más grueso de 15 g (8, 10, 15 g) como sigue. Se aplicó un filamento de von Frey individual al animal de prueba en dirección desde abajo hacia arriba y se tocó precisamente en el medio de cada zarpa (puesta hacia abajo) de las patas traseras de la rata cinco veces consecutivas o hasta que apareció una respuesta. Se repitió la prueba con cada uno de los diferentes filamentos elegidos con un intervalo mínimo de 90 segundos. Si la rata levantaba su zarpa al menos 3 veces por sesión, se consideraba como nivel de sensibilidad al dolor mínimo.

El tratamiento con gabapentina, y el ensayo de todos los animales, se efectuaron los días 11, 14, 17, 21, 24 y 28 después de cirugía. Los animales que recibían gabapentina se trataron cada día de prueba y se ensayaron dos horas después de cada dosificación, aproximadamente en el mismo momento del día. Los animales que el día 7-8 demostraron déficits motores evidentes por la falta de tono muscular en cualquiera de los miembros traseros, o falta de reflejo de retirada, se excluyeron del estudio.

Para valorar la sensibilidad al dolor durante el experimento, se dispusieron las ratas dentro de la cámara de plexiglas durante un periodo de aclimatación de 15-20 minutos. Posteriormente, se evaluó en las ratas la alodinia táctil (dolor por estímulos que no son normalmente dolorosos) usando un filamento de von Frey en el intervalo del filamento más fino de 0,6 g al más grueso de 15 g (0,6, 1,4, 2, 4, 6, 8, 10, 15 g) como anteriormente para establecer el umbral de dolor basal, excepto porque, inicialmente, el filamento de von Frey más fino tocaba la zarpa trasera 5 veces consecutivas o hasta que apareciera respuesta. Si no aparecía respuesta, se aplicaba el siguiente filamento más fino de la misma manera, repitiendo hasta obtener una respuesta de retirada. Una vez se obtuvo la respuesta de retirada, se volvió a probar la zarpa con el filamento o filamentos descendentes anteriores hasta no observar respuesta. El intervalo entre filamentos sucesivos se mantuvo en no más de aproximadamente 90 segundos. Se probaron en cada animal ambas zarpas traseras de esta manera en primer lugar la pata derecha (la pata inyectada) y entonces la pata izquierda. La cantidad mínima de fuerza requerida para desencadenar una respuesta se registra como el umbral de retirada en gramos.

Se administró gabapentina (GBP) por vía intraperitoneal (IP) en cada día de ensayo (D11, D14, D17, D21, D24, D28 y D35). Se administraron PDAC™ por vía intravenosa (IV) el día 7 u 8.

Se presenta una línea temporal de las actividades de ensayo en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1. Línea temporal

Actividad	Día -1	Día 0	Día 7-8*	Días 11, 14, 16 o 17, 21,
-----------	--------	-------	----------	---------------------------

				23 o 24, 28 y 35
Prueba de inclusión en VFF	X			
Cirugía		X		
Dosificación de GP 50 o 100 MPK de los grupos apropiados: 2 h antes del ensayo				X
Inclusión/exclusión para valor basal de dolor y función motora			X	
Prueba de VFF			X	
Asignación de grupo			X	
Administración de citoblastos placentarios			X	

\*Puede hacerse el día 7 u 8

## Resultados

La administración de PDAC™ al nivel de dosificación de  $10 \times 10^7$  mejoraba significativamente las puntuaciones de sensibilidad en el ensayo en comparación con los animales tratados con vehículo, particularmente en D21, D28 y D35; es decir, los animales manifestaban una alodinia reducida. Véase la FIG. 1. Los resultados para esta dosificación eran comparables con GBP 50 mg/kg. Se calculó una puntuación de mitigación del dolor agregada, denominada TOPAR (mitigación del dolor total), como el área bajo la curva (AUC) de la reducción de sensibilidad mecánica después del tratamiento. Este análisis confirma que los PDAC™ mejoraban significativamente las puntuaciones de sensibilidad al dolor. Véase la FIG. 2. Por tanto, estos análisis confirman que los PDAC™ pueden usarse para tratar el dolor.

## 6.2 EJEMPLO 2: ESTUDIO PRECLÍNICO QUE ESTABLECE LA EFICACIA DE PDAC™ EN EL TRATAMIENTO DE DOLOR DE CÁNCER Y DOLOR INFLAMATORIO

Este ejemplo describe estudios para demostrar la eficacia de citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PDAC™) en el tratamiento de dolor de cáncer y dolor inflamatorio.

### 6.2.1 Dolor de cáncer óseo

Se usan ratones macho inmunocomprometidos de cinco semanas de edad (CB17-SCRF; Taconic Laboratories) albergados en una barrera libre de gérmenes. A las 6 semanas de edad, se efectúan medidas basales de las sensibilidades mecánica y térmica. El día siguiente, se anestesian los ratones con ketamina 100 mg/kg y xilazina 20 mg/kg y se inoculan en el ventrículo cardiaco izquierdo  $5 \times 10^4$  células PC3-ML en 100 µl de DMEM/F12 libre de suero. Este procedimiento produce consistentemente tumores esqueléticos en tibias y fémures de >80 % de los ratones inoculados; sin embargo, las células PC3-ML no metastatizan a ningún órgano de tejido blando con excepción de tumores pequeños producidos en las glándulas suprarrenales. Se genomanipulan las células PC3-ML para expresar establemente una variante brillante de la proteína fluorescente verde (eGFP), que permite la visualización de la diseminación de las células en el esqueleto por microscopía de fluorescencia.

Inicialmente, se miden las hipersensibilidades mecánica y térmica los días 1, 4, 7, 10, 14, 21 y 28 después de la inoculación de células PC13-ML para determinar el transcurso temporal del desarrollo y persistencia del dolor. Una vez se ha identificado el inicio de cambios cuantificables y estadísticamente significativos de la sensibilidad al dolor, se examinan los efectos de los citoblastos placentarios. Se administran los citoblastos placentarios después del inicio del dolor, con valoraciones periódicas del dolor realizadas durante el periodo de estudio. Se administran PDAC™ a ratones experimentales a dosis de, p. ej.,  $0,1 \times 10^6$  células,  $0,6 \times 10^6$  células y  $1,5 \times 10^6$  células por dosis. Los animales de control reciben solo vehículo. Por tanto, por ejemplo, si aparecen cambios estadísticamente significativos en la sensibilidad al dolor de media el día 12 después de inoculación, se administran PDAC™ a una de las tres dosificaciones ese día, antes del ensayo de dolor, y se realizan las valoraciones del dolor los días 13, 16, 23 y 30. Opcionalmente, el estudio incluye una segunda administración de PDAC™ si hay una atenuación inicial de la hipersensibilidad al dolor seguida de recurrencia.

Los ratones que no demuestran cambios en la sensibilidad al dolor en la primera fase del estudio (es decir, la administración de PDAC™ después del desarrollo del dolor) se excluyen del estudio.

### 6.2.2 Dolor inducido por quimioterapia

Este estudio demuestra la eficacia de los citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> frente a dolor neuropático inducido por paclitaxel. En el estudio, se inyecta a ratones (C57BL/6J) paclitaxel como agente quimioterapéutico. El paclitaxel se ha demostrado que produce dolor neuropático tanto en seres humanos como en

animales (véanse, p. ej., Authier et al., "Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies," *Neurotherapeutics* 6: 620-629 (2009); Gauchan et. al., 2009; Golden y Johnson, 2004).

Se determinan las sensibilidades basales antes de la administración de paclitaxel. Se administra entonces a los ratones una dosis de paclitaxel (5 mg/kg, i.p.) y se miden las hipersensibilidades mecánica y térmica los días 1, 4, 7, 10 y 14. Las sensibilidades al dolor tienen típicamente el máximo a los 14 días en este modelo, y persisten hasta los 35 días. Se administran PDAC™ a los ratones experimentales a dosis de, p. ej.,  $0,1 \times 10^6$  células,  $0,6 \times 10^6$  células y  $1,5 \times 10^6$  células por dosis) el día 14, antes del ensayo. Los animales de control reciben solo vehículo. Se realizan las valoraciones de sensibilidad al dolor para todos los animales los días 15, 21, 28 y 35. Los animales de control positivo reciben gabapentina o morfina, administradas a dosis eficaces.

### 6.2.3 Modelo de dolor inflamatorio

Este estudio demuestra la eficacia de los citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> frente al dolor en un modelo de dolor inflamatorio.

Los ratones (C57BL/6J) reciben una inyección subcutánea de 20 µl de una dosis inflamatoria de coadyuvante completo de Freund (CFA; al 50 % disuelto en solución salina) en la superficie plantar de la zarpa trasera. Las sensibilidades al dolor tienen típicamente el máximo a las 3 horas después de la inyección de CFA y pueden persistir hasta 14 días. Se administran PDAC™ a ratones experimentales a dosis de, p. ej.,  $0,1 \times 10^6$  células,  $0,6 \times 10^6$  células y  $1,5 \times 10^6$  células por dosis, 3 horas después de la administración de CFA. Se administra a los ratones de control positivo una dosis eficaz en la reducción del dolor de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, p. ej., celecoxib (CELEBREX®). Se miden entonces las hipersensibilidades mecánica y térmica los días 1, 3, 7 y 14.

Para cada uno de los estudios de dolor anteriores, se valora la alodinia mecánica usando filamentos de von Frey como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Se valora la sensibilidad térmica usando el procedimiento de Hargreaves. El ensayo de Hargreaves mide la sensibilidad nociceptiva en un animal de movimiento libre al enfocar una fuente de calor radiante sobre la superficie plantar de una zarpa trasera del animal cuando permanece en una cámara de plexiglás, y medir la latencia de retirada de su zarpa del calor. La sensibilidad al frío se valorará usando acetona; en este método, se aplica una gota de acetona a una zarpa trasera seguido de evaporación y se mide la latencia de retirada de la zarpa de una superficie.

En cada uno de los estudios, se administran PDAC™ por vía IV en la vena de la cola. El vehículo de control en cada estudio es dextrano 40 al 5 % en tampón salino.

## 6.3 EJEMPLO 3: TRATAMIENTO DE DOLOR NEURÓPÁTICO USANDO PDAC™

### 6.3.1 Administración intravenosa

#### Caso 1

Un individuo presenta dolor neuropático en las extremidades relacionado con la administración de paclitaxel. El oncólogo tratante indica que el mantenimiento de la terapia de paclitaxel está fuertemente indicado. Se efectúa una valoración del dolor usando la escala de valoración de la calidad del dolor, con la calidad del dolor indicada en una escala de 0-10 para cada tipo indicado de dolor. Se registra también una puntuación agregada. Después de la valoración del dolor, se administran al individuo  $1 \times 10^9$  citoblastos placentarios CD34<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PDAC™) en solución salina normal por infusión intravenosa. Se monitoriza en el individuo los siguientes 7 días cualquier evento adverso y se vuelve a valorar el dolor el día 7 después de la administración. Se comparan las puntuaciones para cada calidad de dolor individual y la puntuación de dolor agregada final con las puntuaciones antes de la administración. Si la mayoría de las puntuaciones de calidad de dolor, o la puntuación agregada, no se reducen después de la administración, se proporciona opcionalmente al individuo una segunda administración de  $1 \times 10^9$  PDAC™ en solución salina normal por infusión intravenosa. Se monitoriza entonces el individuo durante el transcurso de la terapia de paclitaxel, y opcionalmente durante 6 meses después; se repite la administración de PDAC™ en cualquier momento en que se determine que aumenta el dolor relacionado con paclitaxel por la escala de valoración de la calidad del dolor.

#### Caso 2

Un individuo diabético de 78 años presenta neuropatía diabética experimentada principalmente en las piernas con implicación aparente del nervio ciático, lo que hace difícil caminar. Se valora el dolor del individuo usando la escala numérica de valoración del dolor, tanto cuando el individuo está sentado como cuando el individuo camina. Después de la valoración del dolor, se administran al individuo  $1 \times 10^9$  citoblastos placentarios CD34<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PDAC™) en solución salina normal por infusión intravenosa. Se monitoriza en el individuo durante los siguientes 7 días cualquier evento adverso, y se vuelve a valorar el dolor el día 7 después de la administración, de nuevo mientras el individuo está sentado y mientras el individuo camina. La administración se considera exitosa si el individuo indica reducción del dolor cuando está sentado, caminando o ambos. Opcionalmente, si el individuo indica mejora mientras está sentado o caminando, pero no ambos, puede administrarse al individuo una segunda dosis de PDAC™ equivalente a la primera. Se monitoriza entonces el individuo durante los siguientes 6 meses cada 1-2 semanas, y

tiene lugar una administración o administraciones de seguimiento siempre que se determine que empeora el dolor según la escala numérica de valoración del dolor.

#### Caso 3

5 Un individuo de 62 años presenta neuralgia posherpética. Los registros médicos del individuo confirman un caso anterior de herpes con sarpullido y pústulas herpéticas acompañantes en el área dorsal derecha del individuo. Sin embargo, el dolor asociado al herpes no se ha resuelto después de un mes tras la curación del sarpullido y pústulas. Se valora el dolor del individuo usando la escala numérica de valoración del dolor. Después de la valoración del dolor, se administran al individuo  $1 \times 10^9$  citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PDAC™) en solución salina normal por infusión intravenosa. Se monitoriza en el individuo durante los siguientes 7 días cualquier evento adverso y se vuelve a valorar el dolor el día 7 después de la administración.

#### Caso 4

15 Un individuo presenta dolor neuropático en las extremidades relacionado con una lesión anterior. El cirujano tratante indica que los narcóticos y AINE no conseguían tratar la afección. Se efectúa una valoración del dolor usando la escala de valoración de la calidad del dolor, con la calidad del dolor indicada en una escala de 0-10 para cada tipo indicado de dolor. Se registra también una puntuación agregada. Después de la valoración del dolor, se administran al individuo  $1 \times 10^9$  citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PDAC™) en solución salina normal por infusión intravenosa. Se monitoriza en el individuo durante los 7 días siguientes cualquier evento adverso y se vuelve a valorar el dolor el día 7 después de la administración. Se comparan las puntuaciones para cada calidad de dolor individual y la puntuación de dolor agregado total con las puntuaciones antes de la administración. Si la mayoría de las puntuaciones de calidad de dolor, o la puntuación agregada, no se reducen después de la administración, se proporciona al individuo opcionalmente una segunda administración de  $1 \times 10^9$  PDAC™ en solución salina normal por infusión intravenosa. Se monitoriza entonces el individuo durante el transcurso de la terapia con paclitaxel y, opcionalmente, durante 6 meses después; se repite la administración de PDAC™ en cualquier momento en que se determine que aumenta el dolor relacionado con paclitaxel por la escala de valoración de la calidad del dolor.

#### 25 **6.3.2 Administración local**

Un individuo de 62 años presenta neuralgia posherpética. Los registros médicos del individuo confirman un caso anterior de herpes con sarpullido y pústulas herpéticas acompañantes. Sin embargo, el dolor asociado al herpes no se ha resuelto un mes después de la curación de sarpullido y pústulas. Se valora el dolor del individuo usando la escala numérica de valoración del dolor. Después de la valoración del dolor, se administran al individuo  $3 \times 10^7$  citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PDAC™) en una solución de plasma rico en plaquetas en una serie de 10 inyecciones adyacentes al tronco nervioso que sirve al área del individuo afectada por el herpes. Se monitoriza en el individuo durante los siguientes 7 días cualquier evento adverso y se vuelve a valorar el dolor el día 7 después de la administración.

#### **6.4 EJEMPLO 4: TRATAMIENTO DE VULVODINIA USANDO PDAC™**

35 Un individuo femenino de 41 años presenta vulvodinia. Antes del tratamiento, se determinan los sitios exactos de dolor con puntas de algodón y palpación digital suave. Se valora el dolor del individuo usando la escala numérica de valoración del dolor. Después de la valoración del dolor, se procuran al individuo  $1 \times 10^9$  citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PDAC™) en una solución de plasma rico en plaquetas por administración intravaginal a los sitios de dolor. Se monitoriza en el individuo durante los siguientes 7 días cualquier evento adverso y se vuelve a valorar el dolor el día 7 después de la administración.

#### **6.5 EJEMPLO 5: TRATAMIENTO DE CISTITIS INTERSTICIAL USANDO PDAC™**

45 Se diagnostica un individuo femenino de 29 años con cistitis intersticial. Se valora el dolor del individuo usando la escala numérica de valoración del dolor. Después de la valoración del dolor, se procuran al individuo  $1 \times 10^9$  citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PDAC™) en una solución de plasma rico en plaquetas por vía intravesical, en cualquier lado del cuello de la vejiga y otros sitios pélvicos que el individuo ha identificado como dolorosos con la palpación durante el examen. Se monitoriza en el individuo durante los siguientes 7 días cualquier evento adverso y se vuelve a valorar el dolor el día 7 después de la administración. Se valora también el individuo por urianálisis y biomarcadores para cistitis intersticial el día 7 después de la administración.

#### **6.6 EJEMPLO 6: ATENUACIÓN DEL DOLOR EN INFLAMACIÓN PERINEURAL EN RATAS USANDO PDAC™**

55 Este ejemplo describe un estudio que usa un modelo de neuritis en rata para evaluar el efecto de citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> (PDAC™) sobre el dolor neuropático y para valorar los cambios *ex vivo* potenciales que pueden mediar los efectos celulares. El modelo de neuritis es un modelo establecido de dolor neuropático motivado por inflamación perineural. En este modelo, se induce la inflamación perineural en la proximidad del nervio ciático de ratas. El dolor se desarrolla en el órgano diana nervioso (zarpa trasera) en 2-3 días y se resuelve en aproximadamente 8 días.

Procedimiento experimental

Se usaron ratas Sprague Dawley macho de tres meses de edad de un peso inicial de aproximadamente 250-300 g. Se incluyeron 4 grupos en el estudio: 0,4, 1 o 4 millones de PDAC™ y el vehículo de control. Los pesos mínimo y máximo de las ratas están dentro de intervalo del  $\pm 20$  %.

- 5 Durante la anestesia quirúrgica (ketamina 50 mg/kg y xilazina 7,5 mg/kg, inyectadas IM), se expuso el nervio ciático común de las ratas a mitad de muslo y se envolvió con portador biocompatible estéril empapado con 200  $\mu$ l de carragenano lambda al 1 % (Sigma-Aldrich n° CAS: 9064-57-7). Tres días después de la cirugía, se valoró en los animales la hipersensibilidad mecánica como medida indirecta del dolor en las zarpas traseras. Se midió la alodinia táctil valorando la respuesta de retirada a fibras de von Frey calibradas. Se emplearon tres fibras según la aplicación de fuerza, fibra de fuerza baja (8 g), media (16 g) y alta (26 g) en este estudio. Se aplicó cada fibra en la superficie plantar de ambas zarpas traseras 5 veces y se calculó la respuesta porcentual.

- 10 El día 4 después de la inducción de inflamación perineural, se trataron los animales con PDAC™ a la dosis de 0,4, 1 o 4 millones o vehículo inmediatamente después de la valoración de la alodinia. Se proporcionó el tratamiento por vía intravenosa a través de la vena de la cola. En diversos puntos temporales después del tratamiento, se valoró en los animales la alodinia mecánica aplicando el mismo procedimiento que en el día 3 después de la cirugía. Se valoraron los niveles de dolor los días 0, 3, 4, 6 y 8. Se analizaron muestras de tejido que incluyen nervio ciático, nódulo linfático de drenaje y plasma.

Resultados

- 20 Los resultados demostraron que los PDAC™ a la dosis de 4 millones y 1 millón reducían el dolor significativamente en comparación con el grupo de vehículo los días 4, 6 y 8, mientras que los PDAC™ a 0,4 millones mostraban tendencia a reducción del dolor el día 4. Los análisis *ex vivo* de tejido demostraron que los PDAC™ suprimían el cebado y activación de linfocitos T en nódulo linfático de drenaje al suprimir la activación de células presentadoras de antígeno, incluyendo células dendríticas y macrófagos. Los PDAC™ reducían la producción de interferón gamma, IL-17, mientras que aumentaban la de IL-10 en nódulo linfático de drenaje así como en el nervio ciático ipsilateral, sugiriendo que los PDAC™ modulan la diferenciación de linfocitos T. Además, en nervio ciático ipsilateral, se observaba significativamente menos infiltración leucocítica en animales tratados con PDAC™.

**6.7. EJEMPLO 7: PRODUCCIÓN DE CITOBLASTOS PLACENTARIOS**

Este ejemplo demuestra el aislamiento de citoblastos placentarios

- 30 Compendio: Se extirpa tejido placentario y se digiere, seguido de cultivos primarios y de expansión para conseguir un producto celular expandido que produce muchas dosis de células. Se almacenan las células en un banco celular de dos niveles y se distribuyen como producto celular congelado. Todas las dosis de células derivadas de la placenta de una única donante se definen como un lote, y se procesa un lote de placenta a la vez usando técnicas estériles en una sala dedicada y una campana de flujo laminar de clase 100. Se define el producto celular por ser CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup>, tener un cariotipo normal y nada o sustancialmente nada de contenido de células maternas.

**6.7.1 Obtención de citoblastos**

- 40 *Extirpación y digestión de tejido:* Se obtiene una placenta menos de 24 horas después de la expulsión. Se obtiene tejido de placenta del amnios, una combinación de amnios y corion o corion. Se pica el tejido en trozos pequeños de aproximadamente 1 mm de tamaño. Se digiere el tejido picado en colagenasa 1A 1 mg/ml durante 1 hora a 37 °C seguido de tripsina-EDTA durante 30 minutos a 37 °C. Después de tres lavados con FBS al 5 % en PBS, se resuspende el tejido en medio de cultivo.

- 45 *Cultivo primario:* Se suspende el tejido digerido en medio de cultivo y se dispone en matraces T Corning que se incuban en una cámara humidificada mantenida a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se repone la mitad del medio después de 5 días de cultivo. Se forman colonias de células de alta densidad a las 2 semanas de cultivo. Se recolectan las colonias con tripsina-EDTA, que se inactivan entonces con FBS al 2 % en BS. Se centrifugan las células y se resuspenden en medio de cultivo para sembrar cultivos de expansión. Se definen estas células como células de pase 0 que se han duplicado 0 veces.

- 50 *Cultivo de expansión:* Se usan células recolectadas de cultivo primario, recolectadas de cultivo de expansión o descongeladas del banco celular para sembrar cultivos de expansión. Se tratan Cell Factories (NUNC™) con CO<sub>2</sub> al 5 % en aire a 50 ml/min/bandeja durante 10 min a través de un filtro estéril y se calientan en una incubadora humidificada mantenida a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se recuentan las siembras celulares en un hematocitómetro con azul de tripano y se registran número de células, viabilidad, números de pases y número acumulado de duplicaciones. Se suspenden las células en medio de cultivo a aproximadamente 2,3 x 10<sup>4</sup> células/ml y se siembran 110 ml/bandeja en Cell Factories. Después de 3-4 días, y de nuevo a los 5-6 días de cultivo, se retira el medio de cultivo y se reemplaza por medio reciente, seguido de otro tratamiento con CO<sub>2</sub> al 5 % en aire. Cuando las células alcanzan aproximadamente 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>, se recolectan las células con tripsina-EDTA, seguido de inactivación con FBS al 2 % en PBS. Se centrifugan entonces las células y se resuspenden en medio de cultivo.

*Crioconservación:* Se recolectan las células para congelar del cultivo con tripsina-EDTA, se inactivan con FBS al 2 % en PBS y se recuentan en un hematocitómetro. Después de centrifugación, se resuspenden las células con DMSO al 10 % en FBS a una concentración de aproximadamente 1 millón de células/ml para usar las células para ensamblaje de un banco celular, y 10 millones de células/ml para las dosis de células congeladas individuales. Se transfiere la solución de células a un recipiente de congelación, que se dispone en un baño de alcohol isopropílico en un congelador a -80 °C. El día siguiente, se transfieren las células a nitrógeno líquido.

## 6.8 EJEMPLO 8: IDENTIFICACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE CITOBLASTOS PLACENTARIOS

Se compararon patrones de expresión génica de citoblastos placentarios como se preparan en el Ejemplo 7 a partir de amnios-corion (AC) y cordón umbilical (UC) con los patrones de expresión génica de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea (BM) multipotentes y fibroblastos dérmicos (DF), considerándose los últimos terminalmente diferenciados. Se hicieron crecer las células durante un único pase, un número intermedio de pases y un gran número de pases (incluyendo hasta senescencia). Los resultados indican que el número de duplicaciones de población tiene un impacto importante sobre la expresión génica. Se identificó un conjunto de genes que se regulan positivamente en AC y UC, y se regulan negativamente o están ausentes en BM y DF, y que se expresan independientemente del número de pases. Los citoblastos placentarios y citoblastos de cordón umbilical se referirán colectivamente de aquí en adelante en este ejemplo como citoblastos AC/UC.

### 6.8.1 Métodos y materiales

#### 6.8.1.1 Células y cultivo celular

Se adquirieron BM (nº de cat. PT-2501) y DF (nº de cat. CC-2511) en Cambrex. Las AC y UC se originaron a partir de matraces de cultivo de tejido de pase 0. Las AC y UC en los matraces se obtuvieron por digestión de una placenta de donante. Se sembraron matraces de cultivo T-75 a 6000 células/cm<sup>2</sup> y se sometieron a pases las células cuando se volvieron confluentes. Se estimaron las duplicaciones de población a partir de recuentos celulares con azul de tripano. Se ensayó en los cultivos la expresión génica después de 3, 11-14 y 24-38 duplicaciones de población.

#### 6.8.1.2 ARN, micromatrices y análisis

Se lisaron directamente células en sus matraces de cultivo de tejido, con la excepción de un cultivo que se tripsinizó antes de la lisis. Se aisló el ARN total con el kit RNeasy de QIAGEN. Se determinaron la integridad y concentraciones de ARN con un Agilent 2100 Bioanalyzer. Se hibridaron 10 microgramos de ARN total de cada cultivo en una plataforma Affymetrix GENECHIP®. Se convirtió el ARN total en ARNc marcado y se hibridó con matrices oligonucleotídicas Human Genome U133A 2.0 según los métodos del fabricante. Se procesaron los archivos de imágenes con el software Affymetrix MAS 5.0 y se normalizaron y analizaron con el software Agilent GeneSpring 7.3.

### 6.8.2 Resultados

#### 6.8.2.1 Selección de los puntos temporales de cultivo de citoblastos de BM-MSC, AC/UC y DF para análisis de micromatriz

Para establecer un patrón de expresión génica único de citoblastos de AC/UC, se cultivaron dos estirpes de citoblastos, AC(6) y UC(6), en paralelo con BM-MSC y DF. Para maximizar la identificación de un perfil de expresión génica atribuible al origen celular y minimizar las influencias exógenas, se hicieron crecer todas las células en el mismo medio, se sembraron y se subcultivaron usando los mismos criterios. Se recolectaron las células después de 3 duplicaciones de población, 11-14 duplicaciones o 35 duplicaciones o senescencia, lo que sucediera primero. Los genes cuya expresión en citoblastos de AC/UC no cambia por el tiempo en cultivo y están regulados positivamente respecto a BM y DF son candidatos a genes específicos de citoblastos de AC/UC.

Se recogieron muestras (BM, AC(6) y UC(6)) y se recolectaron después de tres duplicaciones de población; estas muestras se consideraron como en cultivo durante un periodo "corto" de tiempo. No se recogió una muestra de DF a corto plazo. Los cultivos de longitud intermedia, 11 a 14 duplicaciones, se recogieron para todos los tipos celulares. Los cultivos a largo plazo se recogieron de todas las estirpes celulares a aproximadamente 35 duplicaciones de población o justo antes de la senescencia, lo que sucediera antes. La senescencia apareció antes de 15 duplicaciones para BM y de 25 duplicaciones para DF. Las células BM y DF adquiridas se expandieron muchas veces antes del análisis genético, y no pueden considerarse de estadio temprano. Sin embargo, operativamente, las BM crecidas durante tres duplicaciones (BM-03) se consideran un cultivo a corto plazo. Igualmente, se hace referencia operativamente a BM-11 como un cultivo de longitud intermedia, pero debido a que la senescencia aparecía a las 14 duplicaciones, BM-11 es lo más probablemente un cultivo a largo plazo biológicamente.

#### 6.8.2.2 El agrupamiento jerárquico muestra el parentesco entre citoblastos de BM, AC/UC y DF

El análisis de micromatriz identifica patrones de expresión génica, y el agrupamiento jerárquico (HC) intenta encontrar similitudes en el contexto de dos dimensiones: genes en la primera dimensión y condiciones diferentes (diferentes muestras de ARN) en la segunda. Los GeneChips usados en este experimento contenían más de 22.000 conjuntos de sondas (a los que se hace referencia como "lista de todos los genes"), pero muchos de estos conjuntos examinan

genes que no se expresan en ninguna condición. Para reducir la lista de todos los genes, se eliminaron los genes no expresados o expresados a bajos niveles (valores brutos menores de 250) en todas las muestras, procurando una lista de 8.215 genes.

### 6.8.2.3 Métodos de filtración usados para identificar los genes específicos de citoblastos de AC/UC

- 5 Los genes que permanecen constantes en todas las muestras de AC/UC y están regulados negativamente en BM y DF se consideran específicos de citoblastos de AC/UC. Se combinaron dos métodos de filtración para crear una lista de 58 genes específicos de citoblastos de AC/UC (Tabla 2).

Tabla 2: 58 genes específicos de citoblastos placentarios o citoblastos de cordón umbilical

Símbolo	Gen	Proceso biológico, descripción y anotación adicional
ACTG2	Actina, gamma 2, músculo liso, entérico	Desarrollo muscular, citoesqueleto, expresado en arteria de cordón umbilical y epitelio prostático
ADARB1	Adenosina desaminasa, específico de ARN, B1 (homólogo de RED1 de rata)	Procesamiento de ARN, desarrollo del sistema nervioso central
AMIGO2	Gen inducido por anfoterina 2	Adhesión celular homófila y heterófila, molécula de adhesión con dominio de tipo Ig 2
ARTS-1	regulador aminopeptidasa de la efusión de receptor de factor de necrosis tumoral de tipo 1	Proteólisis, procesamiento de antígenos, angiogénesis, expresado en placenta
B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta-1,4-galactosiltransferasa, polipéptido 6	Metabolismo de carbohidratos, integral de la membrana, puede funcionar en reconocimiento y/o adhesión intercelular
BCHE	Butirilcolinesterasa	Actividad colinesterasa, actividad serinesterasa, actividad hidrolasa
C11orf9	Marco de lectura abierto 9 del cromosoma 11	Proteína hipotética, factor de transcripción de tipo p53, expresado en epitelio de pigmento retinal
CD200	Antígeno CD200	De tipo inmunoglobulina, proteína de superficie, inhibe macrófagos
COL4A1	Colágeno, tipo IV, alfa I	ECM, membrana basal, colágeno afibrilar, contiene dominio de arresteno
COL4A2	Colágeno, tipo IV, alfa 2	ECM, biogénesis, membrana basal, coexpresado con COL4A1, regulado negativamente en epitelio displásico
CPA4	Carboxipeptidasa A4	Proteolítico, acetilación de histonas, impronta materna, alta expresión en estirpes celulares de cáncer de próstata
DMD	Distrofina (distrofia muscular, tipos de Duchenne y Becker)	Contracción muscular, forma celular y tamaño celular, desarrollo muscular
DSC3	Desmocolina 3	Adhesión célula-célula homófila, localizado en desmosomas
DSG2	Desmogleína 2	Adhesión célula-célula homófila, localizado en desmosomas
ELOVL2	Alargamiento de ácidos grasos de cadena muy larga de tipo (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, levadura) 2	Biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis lipídica
F2RL1	Tipo receptor de factor de coagulación II (trombina) 1	Ruta de señalización de proteína receptora acoplada a proteína G, altamente expresado en

ES 2 707 579 T3

		epitelios de colon y elementos neuronales
FLJ10781	Proteína hipotética FLG10781	-
GATA6	Proteína de unión a GATA 6	Factor de transcripción, desarrollo muscular
GPR126	Receptor acoplado a proteína G 126	Transducción de señal, ruta de señalización de neuropéptidos
GPRC5B	Receptor acoplado a proteína G, familia C, grupo 5, miembro B	Ruta de señalización de proteína receptora acoplada a proteína G
ICAM1	Molécula de adhesión intercelular 1 (CD54), receptor de rinovirus humano	Adhesión célula-célula, adhesión celular, actividad receptora transmembrana, expresado en epitelio conjuntivo
IER3	Respuesta inmediata temprana 3	Antiapoptosis, embriogénesis y morfogénesis, crecimiento y/o mantenimiento celular
IGFBP7	Proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina 7	Regulación negativa de la proliferación celular, sobreexpresado en células epiteliales senescentes
IL1A	Interleucina 1, alfa	Respuesta inmunitaria, transducción de señal, actividad citocina, proliferación celular, diferenciación, apoptosis
IL1B	Interleucina 1, beta	Respuesta inmunitaria, transducción de señal, actividad citocina, proliferación celular, diferenciación, apoptosis
IL6	Interleucina 6 (interferón beta 2)	Transducción de señal ligada a receptor de superficie celular, respuesta inmunitaria
KRT18	Queratina 18	Morfogénesis, filamento intermedio, expresado en placenta, tejidos fetal y epitelial
KRT8	Queratina 8	Organización y biogénesis de citoesqueleto, fosforilación, filamento intermedio, coexpresado con KRT1B
LIPG	Lipasa, endotelial	Metabolismo lipídico, actividad lipoproteína lipasa, transportador lipídico, actividad fosfolipasa, implicado en la biología vascular
LRAP	Arginina aminopeptidasa derivada de leucocitos	Procesamiento de antígenos, antígenos endógenos a través de MHC de clase I; actividad aminopeptidasa N-terminal
MATN2	Matrilina 2	Ampliamente expresado en estirpes celulares de origen fibroblástico o epitelial, ECM de cartílago no articular
MEST	Homólogo de transcrito específico de mesodermo (ratón)	Gen de impronta paterna, desarrollo de tejidos mesodérmicos, expresado en tejidos fetales y fibroblastos
NFE2L3	Tipo factor nuclear (derivado de eritroide 2) 3	Cofactor de transcripción, altamente expresado en citotrofoblastos placentarios primarios pero no en fibroblastos placentarios
NUAK1	Familia NUAK, cinasa de tipo SNF1, 1	Fosforilación de aminoácidos de proteína, actividad proteína serina-treonina cinasa
PCDH7	Protocaderina BH (de cerebro-corazón)	Adhesión y reconocimiento célula-célula, contiene 7 repeticiones de caderina
PDLIM3	Dominio 3 de PDZ y LIM	Proteína LIM asociada a alfa-actinina 2, unión a proteína citoesquelética, expresado en músculo

		esquelético
PKP2	Placofilina 2	Adhesión célula-célula, localizado en desmosomas, encontrado en epitelios, se une a caderina y filamento intermedio
RTN1	Reticulón 1	Transducción de señal, diferenciación de neuronas, secreción neuroendocrina, tráfico de membrana en células neuroendocrinas
SERPINB9	Inhibidor de serinpeptidasa, clado B (ovoalbúmina) miembro 9	Inhibidor de serinproteasa, coagulación, fibrinólisis, fijación de complemento, remodelación de matriz, expresado en placenta
ST3GAL6	Sialiltransferasa 10	Metabolismo de aminoazúcares, glicosilación de aminoácidos proteicos, metabolismo glicolipídico, lipoilación de proteínas
ST6GALNAC5	Sialiltransferasa 7E	Glicosilación de aminoácidos proteicos, biosíntesis de gangliósidos
SLC12A8	Familia de portadores de solutos 12 (transportadores de sodio/potasio/cloruro), miembro 8	Actividad transportadora de aminoácidos-poliamina, cotransportador de catión cloruro 9, posible papel en inmunidad epitelial (psoriasis)
TCF21	Factor de transcripción 21	Regulación de la transcripción, desarrollo de mesodermo, encontrado en células epiteliales del riñón
TGFB2	Factor de crecimiento transformante beta 2	Regulación del ciclo celular, transducción de señal, señalización célula-célula, proliferación celular, crecimiento celular
VTN	Vitronectina (factor de propagación en suero, somatomedina B, proteína de complemento S)	Respuesta inmunitaria, adhesión celular, proteína secretada, se une a ECM
ZC3H12A	Contiene el tipo CCCM de dedo de cinc 12A	Proteína inducida por el tratamiento con MCP-1, unión a ácido nucleico, proteína de dedo de cinc hipotética

5 En primer lugar, se identificaron 58 genes seleccionando aquellos genes sobreexpresados  $\geq$  tres veces en al menos 7 de las 8 condiciones de citoblastos de AC/UC respecto a todas las muestras de BM y DF. La filtración en 8 de las 8 condiciones de citoblastos de AC/UC procuró una lista similar. El segundo método de filtración usaba células "ausentes" y "presentes" proporcionadas por el software Affymetrix MAS 5.0. Se creó una lista identificando los genes ausentes en todas las condiciones de BM y DF y presentes en AC-03, AC-11, UC-03 y UC-11. Las lecturas génicas en las últimas condiciones de citoblastos de AC/UC no se estipularon.

10 Las dos listas se superponían significativamente y se combinaron. La lista combinada se recortó adicionalmente eliminando (1) varios genes expresados a niveles muy bajos en la mayoría o todas las condiciones de citoblastos de AC/UC y (2) genes portados en el cromosoma Y. Se confirmó que las células AC y UC usadas en este estudio eran masculinas por análisis FISH, y las BM y DF derivaban de un donante femenino. La lista resultante de 46 genes específicos de citoblastos de AC/UC se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Genes específicos de AC/UC enumerados por ontología

<u>Adhesión celular</u>	<u>Citoesqueléticos</u>	<u>Desarrollo</u>	<u>ECM</u>	<u>Implicados en endotelio</u>
AMIGO2	ACTG2	ADARB1	COL4A1	ACTG2
B4GALT6	DMD	IER3	COL4A2	C11orf9
DSC3	KRT18	IGFBP7	MATN2	COL4A1
DSG2	KRT8	IL1A	VTN	COL4A2

ICAM1	PDLIM3	IL1B		DSC3
PCDH7		MEST		DSG2
PKP2		TGFB2		F2RL1
VTN				ICAM1
<u>Glicosilación</u>	<u>Respuesta inmunitaria</u>	<u>Proteólisis</u>	<u>Señalización</u>	IGFBP7
B4GALT6	ARTS-1	ARTS-1	F2RL1	IL6
ST3GAL6	CD200	CPA4	GPR126	KRT18
ST6GALNAC5	IL1A	LRAP	GPRC5B	KRT8
<u>Transcripción</u>	IL1B		IL1A	MATN2
C11orf9?	IL6		IL1B	PKP2
GATA6	LRAP		IL6	SLC12A8
NFE2L3	SLC12A8		RTN1	TCF21
TCF21	VTN		TGFB2	

Esta lista de 46 genes codifica una colección de proteínas que presentan una serie de grupos de ontología. El grupo más altamente representado, adhesión celular, contiene 8 genes. Ningún gen codifica proteínas implicadas en la replicación de ADN o la división celular. Se enumeran también 16 genes con referencias específicas a epitelios.

### 5 6.8.3 Discusión

Se identificó un patrón de expresión específico de citoblastos placentarios, y distinguible de células mesenquimatosas derivadas de médula ósea. Operativamente, este patrón incluye 46 genes que se sobreexpresan en todas las muestras de citoblastos placentarios respecto a todas las muestras de BM y DF.

10 El diseño experimental comparaba células cultivadas durante periodos de tiempo en cultivo corto, medios y largo. Para las células de AC y UC, cada periodo de cultivo tiene un conjunto característico de genes expresados diferencialmente. Durante el corto plazo o fase temprana (AC-03 y UC-03), 200 genes regulados positivamente retroceden a la media después de 8 duplicaciones de población.

15 La expresión génica por cultivos de longitud intermedia se define por una división celular rápida y los genes expresados diferencialmente en ese momento son bastante diferentes de los expresados diferencialmente durante la fase temprana. Muchos de los genes regulados positivamente en AC-11 y UC-11, junto con BM-03 y DF-14, están implicados en la replicación cromosómica y división celular. Basándose en la expresión génica, BM-03 parece ser biológicamente un cultivo de medio plazo. En este estadio medio, la expresión génica específica de tipo celular está eclipsada por la proliferación celular. Además, casi todos los genes sobreexpresados en los cultivos de AC o UC a corto plazo están regulados negativamente en las condiciones de estado medio y tardío. 143 genes estaban regulados positivamente  $\geq 5$  veces durante esta fase altamente proliferativa, constituyendo aproximadamente un 1,7 % de los genes expresados.

25 Los cultivos a largo plazo representan la fase final o senescente. En esta fase, las células han agotado su capacidad de dividirse y, especialmente para AC y UC, el número absoluto de genes expresados diferencialmente se reduce notablemente. Esto puede ser el resultado de que las células se adaptan totalmente a su entorno de cultivo y a la carga consiguientemente reducida para biosintetizar. Sorprendentemente, los cultivos de BM y DF tardíos no manifiestan este mismo comportamiento; se expresan diferencialmente un gran número de genes en BM-11 y DF-24 respecto a AC y UC y el valor normalizado de 1. AC y UC son distinguibles de BM y DF en particular en los cultivos a largo plazo.

30 La lista de genes específicos de citoblastos placentarios aquí descrita es diversa. COL4A1 y COL4A2 están regulados coordinadamente y KRT18 y KRT8 también parecen coexpresarse. 8 de los genes codifican proteínas implicadas en el contacto de célula con célula, tres de los cuales (DSC3, DSG2 y PKP2) están localizados en los desmosomas, puntos de contacto intercelular anclados a proteínas del citoesqueleto de filamento intermedio tales como queratina 18 y queratina 8. El contacto estrecho de célula con célula es característico de las células epiteliales y endoteliales y no está asociado típicamente a fibroblastos. La Tabla 3 enumera 16 genes, de los 46 totales, característicos de células epiteliales. Los citoblastos placentarios se describen en general como células con forma de huso pequeñas de tipo fibroblasto. Esta morfología es típicamente distinta de BM y DF, especialmente a densidades celulares menores. Es

también señalable el patrón de expresión de CD200, que está presente en citoblastos de AC/UC y ausente en todas las muestras de BM y DF.

Este subconjunto de genes de 46 genes constituye un conjunto de biomarcadores moleculares que distingue las los citoblastos de AC/UC de los citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea o fibroblastos.

## 5 **6.9 EJEMPLO 9: ATENUACIÓN DE LA ALODINIA Y LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA ASOCIADAS A INFLAMACIÓN PERINEURAL EN RATAS USANDO CITOBLASTOS PLACENTARIOS**

Este ejemplo demuestra que los citoblastos placentarios reducen el dolor neuroinflamatorio a través de un mecanismo que comprende potencialmente la supresión del anidamiento, activación y diferenciación de células dendríticas, la inducción de IL-10 y la modulación de linfocitos T.

### 10 **6.9.1 Materiales y métodos**

#### **6.9.1.1 Animales y procedimiento quirúrgico**

Se efectuaron los estudios usando ratas Sprague Dawley macho de 3 meses de edad, de aproximadamente 250-300 g al inicio del estudio; los pesos mínimo y máximo del grupo estaban en un intervalo de  $\pm 20$  % del peso medio del grupo.

15 Para los procedimientos quirúrgicos, se anestesiaron las ratas con solución de ketamina (50 mg/kg) y xilazina (7,5 mg/kg) que se administró por vía intraperitoneal. Después de la verificación de la anestesia, se afeitó el área de cirugía y se limpió posteriormente con Betadine y alcohol. Se efectuó la cirugía como se describe anteriormente (véase Herzberg et al., Pain, 1999, 83: 169-82). Brevemente, se expuso el nervio ciático común a nivel de mitad de muslo por disección roma a través del bíceps femoral y se separó suavemente del tejido adyacente. Se envolvió el nervio en una  
20 banda (de aprox. 3 mm de ancho y 25 mm de largo) de celulosa oxidada hemostática estéril (SURGICEL™ “de tipo algodón”; Ethicon, J&J, NJ, EE. UU.). Se aplicó la SURGICEL™ pasando unas pinzas curvadas por debajo del nervio (teniendo mucho cuidado de evitar estirar el nervio), agarrando un extremo de la banda y arrastrándola bajo el nervio. El extremo que se agarró se plegó entonces suavemente sobre el nervio, y el otro extremo se plegó en la dirección opuesta. Se envolvió holgadamente la SURGICEL™ alrededor del nervio para no causar constricción nerviosa. Antes  
25 de la aplicación, se inyectaron 0,2 cm<sup>3</sup> de carragenano al 1 % en la banda de SURGICEL™ para inducir una reacción inflamatoria local. Antes del tratamiento el día 3, se asignaron aleatoriamente las ratas a cada grupo de tratamiento.

#### **6.9.1.2 Evaluación de la alodinia táctil**

30 Se midió la alodinia táctil valorando la respuesta de retirada a fibras de von Frey calibradas. Se emplearon en este estudio tres fibras según la aplicación de fuerza, fibras de fuerza baja (8 g), media (16 g) y alta (26 g). Se aplicó cada fibra en la zarpa cinco veces y se calculó la puntuación porcentual de respuestas como se describe anteriormente (véase Flatters et al., Pain, 2004, 109: 150-61).

#### **6.9.1.3 Preparación y administración de citoblastos placentarios**

Se prepararon citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> como se describe en el Ejemplo 7.

35 El tercer día después de la exposición del nervio ciático izquierdo a inflamación perineural, se descongelaron citoblastos placentarios crioconservados en un baño de agua a 37 °C. Se determinó la viabilidad celular por azul de tripano, con una media de viabilidad de aproximadamente un 95 %. Se diluyeron entonces las células con Plasmalyte (Baxter Healthcare Corporation) a  $4 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  o  $4 \times 10^5$  células/ml en un tubo cónico de 50 ml. Se extrajeron posteriormente las células en una jeringa de 1 ml con aguja 26G. Al cabo de 2 horas después de descongelar, se  
40 administró 1 ml de citoblastos placentarios o vehículo a través de la vena de la cola. Se valoraron los niveles de dolor los día 0, 3, 4, 6 y 8.

#### **6.9.1.4 Tejidos animales**

45 Un día después del tratamiento (día 4), se recogieron los nódulos linfáticos inguinales y se congelaron instantáneamente para aislamiento de ARN. Se recolectaron los nervios ciáticos el día 8. Para el análisis de expresión génica, se congelaron instantáneamente los nervios ciáticos para aislamiento de ARN. Para análisis de citometría de flujo, se dispusieron los nervios ciáticos en D-PBS en hielo húmedo. Se extrajo sangre por punción cardiaca en tubos de recogida con EDTA. Inmediatamente, se centrifugaron las muestras de sangre a 1300 rcf durante 10 minutos. Se recogió entonces el plasma y se congeló instantáneamente.

#### **6.9.1.5 Extracción de ARN y PCR cuantitativa**

50 Se pesaron el nervio ciático y nódulos linfáticos de drenajes de rata congelados y se homogeneizaron en un volumen apropiado de tampón de lisis por peso usando un TissueRuptor de Qiagen. Se extrajo el ARN total de nervio ciático y nódulo linfático de drenaje de rata homogeneizados usando el kit RNeasy Lipid Tissue Kit de Qiagen según el protocolo del fabricante. Se determinó la concentración de ARN total por NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Se

5 sintetizó ADNc a partir de ARN aislado usando SuperScript III de Invitrogen. Para expresión génica, se usaron ensayos de expresión génica TaqMan individuales para rata para CD11c, CD86, CD80, CD3d, CD69, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17. Se normalizó la expresión génica relativa usando la expresión de GAPDH y se calculó el cambio en veces usando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 5 **6.9.1.6** Medidas de citocinas

10 Se efectuaron las medidas plasmáticas de citocina usando un kit decaplexado de citocinas de rata de Invitrogen que examinaba GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ . Se analizaron las muestras de plasma según el protocolo del fabricante. Brevemente, se añadieron perlas conjugadas a anticuerpo a la placa de filtración a vacío proporcionada. Se lavaron posteriormente las perlas con la solución de lavado de trabajo. Se añadieron patrones o muestras animales a cada pocillo y se incubó la placa durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital protegido de la luz. Se lavaron los pocillos dos veces y se añadió un anticuerpo de detección biotinilado. Después de 15 1 horas de incubación a temperatura ambiente y lavado, se añadió estreptavidina conjugada con R-ficoeritina a la placa durante 30 minutos. Se lavó la placa 3 veces y se efectuó la adquisición de datos en un Luminex 100 usando software STarStation 2.3. Para ELISA de IL-17, se pesaron los nervios ciáticos y se dispusieron en 300,25  $\mu$ l de medio que contenía: 300  $\mu$ l de reactivo de lisis/extracción de tejido de mamífero Cellytic-MT (Sigma Chemical Co.) y 0,25  $\mu$ l de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma Chemical Co.). Se homogeneizaron entonces las muestras y se centrifugaron (12.500xg durante 10 min). Se recogió el sobrenadante y se determinó el nivel de IL-17 por ELISA (R&D Systems Inc.).

#### 6.9.1.7 Suspensión monocelular y citometría de flujo de nervio ciático

20 Se obtuvieron muestras de nervio ciático recientes y se dispusieron en D-PBS en hielo húmedo. Se disociaron los nervios a una suspensión monocelular usando un kit de disociación neural con papaína y el homogeneizador gentleMACS de Miltenyi Biotech. Brevemente se dispusieron los nervios ciáticos en C-Tubes (Miltenyi Biotech) con 1950  $\mu$ l de mezcla enzimática 1 precalentada a 37 °C. Se dispusieron los C-tubes en gentleMACS y se ejecutó el programa "m-brain-01". Se dispusieron los tubos en un agitador rotatorio y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. 25 Se analizaron los nervios ciáticos en el programa "m\_brain\_02" de gentleMACS. Después, se añadieron 30  $\mu$ l de mezcla enzimática 2. Se incubaron los nervios con rotación suave a 37 °C durante 10 minutos. Se analizaron las muestras de nervio en "m\_brain\_03" de gentleMACS seguido de incubación de 10 minutos a 37 °C. Se pasó la suspensión resultante a través de un tamiz celular de 40  $\mu$ . Se sedimentaron las células a 300xg y se resuspendieron en tampón FACS (PBS-1 % de FBS). Se tiñeron suspensiones monocelulares usando 0,5  $\mu$ g de FITC-CD3 anti-rata de ratón (BD Biosciences) y 0,5  $\mu$ g de subconjunto de PE-macrófagos anti-rata de ratón (antígeno de tipo ED2, BD Biosciences). Se usaron controles de isotipo coincidente para establecer las ventanas de análisis.

#### 6.9.1.8 Inmunohistoquímica

35 Se efectuó inmunotinción siguiendo el protocolo estándar de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Se recolectaron los nervios ciáticos bilateralmente 8 días después de la inducción de neuritis. Brevemente, se fijaron los nervios ciáticos en tampón HOPE como se describe (véase Olert J, Wiedorn KH, Goldmann T, Kuhl H, Mehraein Y, Scherthan H.)

40 Se efectuó la inmunotinción siguiendo el protocolo estándar de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Se recolectaron los nervios ciáticos bilateralmente 8 días después de la inducción de neuritis. Brevemente, se fijaron los nervios ciáticos en tampón HOPE como se describe (véase Olert et al., Pathol Res Pract, 2001,197: 823-6). Se bloquearon secciones histológicas (5 micrómetros) en solución de bloqueo (PBS que contiene 1x caseína, 0,3 % de Triton X-100 y 5 % de suero equino) durante 30 minutos. Se incubaron entonces las secciones durante una noche con uno o dos de los siguientes anticuerpos primarios: CD68 (clon ED1, IgG1 monoclonal de ratón, Santa Cruz Biotechnology), CD4 (IgG policlonal de cabra, Santa Cruz Biotechnology) y CD8 (IgG2a monoclonal de ratón, Santa Cruz Biotechnology). Después de tres lavados en PBS, se incubaron los portaobjetos con los anticuerpos secundarios apropiados durante 30 minutos a temperatura ambiente: IgG2a de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen), IgG1 de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen) y de asno anti-cabra conjugado con Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen). Para tinción nuclear, se aplicó una solución de DAPI 600 nM (Sigma) durante 10 minutos después del último lavado de PBS. Después de lavar con PBS, se montaron los portaobjetos en medios acuosos para fluorescencia (Vector). Se capturaron imágenes de inmunohistoquímica con un microscopio NIKON Eclipse modelo E800 equipado con una cámara digital de alta resolución Nikon DXM1200F conectada con un PC equipado con software NIS Elements para captura y archivo de imágenes.

#### 6.9.1.9 Análisis de datos

55 Se expresan los datos como media  $\pm$  EEM. Se tabularon los datos y se analizaron usando el software StatView versión 5.0 (SAS Institute Inc., San Francisco, California, EE. UU.). Se establecieron los alfa (de dos colas) para significación en todos los análisis en 0,05. Se analizaron los datos de comportamiento con medidas repetidas de análisis de varianza (ANOVA) seguido de prueba post hoc. Para análisis *ex vivo*, se usó la prueba de t de Student de dos colas para identificar las diferencias entre el grupo tratado con vehículo y con células.

**6.9.2 Resultados**

**6.9.2.1 Los citoblastos placentarios alivian la alodinia mecánica**

Se usaron tres monofilamentos calibrados diferentes, incluyendo 8 g, 16 g y 26 g, para ensayar la alodinia mecánica. La respuesta a los estímulos de 16 y 26 g era consistente y repetible el día 3 antes del tratamiento, mientras que las puntuaciones de las ratas no respondían a estímulos de 8 g. Por consiguiente, solo se usaron los datos reunidos por la respuesta a estímulos de 16 y 26 g para el análisis de datos. Como se esperaba, se desarrolló un aumento significativo de respuesta a los estímulos (alodinia) el 3º día después del procedimiento en comparación con el día 0 ante de la inducción de neuritis. No se observó una diferencia significativa entre los grupos tratados con vehículo y citoblastos placentarios en esta fase antes del tratamiento. Aunque el vehículo no tenía efecto sobre la sensibilidad mecánica a estímulos de 26 g, los citoblastos placentarios a  $4 \times 10^6$  reducían significativamente la retirada de zarpa trasera de  $93,3 \% \pm 2,98$  el día 3 a  $46,7 \% \pm 6,80$  y  $36,7 \% \pm 5,37$  los días 6 y 8, respectivamente (Fig. 3A). Se observó una tendencia similar de reducción de dolor por citoblastos placentarios a estímulos de 16 g, en que la retirada de zarpa trasera se redujo de  $57,8 \pm 10,24 \%$  a  $22,2 \pm 7,03 \%$  y  $26,7 \pm 3,33 \%$  los días 6 y 8, respectivamente. No se observó un efecto significativo en la zarpa contralateral (Fig. 3B).

Se examinó adicionalmente el efecto de la dosis de citoblastos placentarios sobre la reducción de alodinia mecánica inducida por neuritis. Aunque los citoblastos placentarios a  $4 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  reducían significativamente la alodinia mecánica en comparación con el grupo de vehículo los días 4, 6 y 8, los citoblastos placentarios a  $4 \times 10^5$  demostraban la tendencia a reducción del dolor solo el día 4 (Fig. 3C). El porcentaje de animales que responde al tratamiento con citoblastos placentarios demostró también dependencia de la dosis (Fig. 3D).

**6.9.2.2 Los citoblastos placentarios suprimen el reclutamiento, activación y diferenciación de células dendríticas.**

Para dilucidar el mecanismo antineuroinflamatorio mediado por citoblastos placentarios, se examinaron células dendríticas en nódulos linfáticos de drenaje. Como se muestra en la Figura 4A, el grupo tratado con citoblastos placentarios tenía una expresión reducida de CD11c. Mientras tanto, los marcadores de activación celular, CD86 y CD80, se suprimían por citoblastos placentarios. En conjunto con la supresión de CD11c, CD86 y CD80, la expresión de IL-12, una citocina proinflamatoria clave secretada por células dendríticas diferenciadas, se reducía también significativamente en nódulos linfáticos de drenajes por citoblastos placentarios (Fig. 4B).

**6.9.2.3 Los citoblastos placentarios suprimen el cebado de linfocitos T y modulan la diferenciación de linfocitos T**

Dada la capacidad deteriorada de las células dendríticas de anidamiento y activación conferidos por citoblastos placentarios, se esperaba que el cebado de linfocitos T por células dendríticas pudiera estar posteriormente afectado. Es más, la expresión del receptor de linfocitos T, CD3, y del marcador de activación de linfocitos T, CD69, era en ambos significativamente menor en el grupo tratado con citoblastos placentarios que en el grupo de control (Fig. 5A), sugiriendo que la proliferación y activación de linfocitos T en nódulos linfáticos de drenaje se suprimen por citoblastos placentarios.

Además, se examinó la subpoblación de linfocitos T auxiliares para ensayar si los citoblastos placentarios tenían efecto sobre la diferenciación de linfocitos T. Como se muestra en las Figuras 5B y 5C, los citoblastos placentarios suprimían significativamente el interferón gamma ( $IFN\gamma$ ) en nódulos linfáticos de drenaje, sugiriendo que los citoblastos placentarios suprimen la diferenciación de linfocitos T Th-1. Además, la expresión de IL-17 en nódulo linfático de drenaje (Fig. 5C) así como en nervio ciático ipsilateral (Fig. 6A y 6B) estaba regulada negativamente por citoblastos placentarios. Por otro lado, se observó la regulación positiva de la citocina antiinflamatoria IL-10 por citoblastos placentarios en nódulos linfáticos de drenaje (Fig. 6C) así como en plasma (Tabla 4). Entre las 9 citocinas proinflamatorias ensayadas en plasma, cuatro citocinas proinflamatorias, incluyendo  $IFN\gamma$ , IL-2, IL-6 e IL-12, estaban reguladas negativamente por citoblastos placentarios, mientras que no se observaba diferencia de IL-1 $\beta$  entre los grupos de citoblastos y vehículo (Tabla 4). Otras citocinas, incluyendo GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-4 y TNF- $\alpha$ , estaban por debajo del nivel de detección en plasma.

Tabla 4. Niveles de citocina en plasma (pg/ml) el día 8 (n= 5)

Citocina	Grupo de vehículo	Grupo de citoblastos placentarios
$IFN\gamma$	$14,4 \pm 5,16$	$10,9 \pm 1,84$
IL-1 $\beta$	$69,6 \pm 8,2$	$73,0 \pm 9,46$
IL-2	$603,8 \pm 57,63$	$419,5 \pm 76,78$
IL-6	$43,8 \pm 3,52$	$33,9 \pm 2,23$
IL-10	$43,1 \pm 4,33$	$75,0 \pm 7,09^*$

IL-12

2976,2 ± 270,9

2491,5 ± 190,9

\*P&lt;0,05

**6.9.2.4** Los citoblastos placentarios suprimen la infiltración de células inmunitarias en nervio ciático ipsilateral

A continuación, se examinó la infiltración de leucocitos en el nervio ciático ipsilateral. Los marcadores de macrófagos, Emrl y CD68, estaban regulados negativamente en el grupo tratado con citoblastos, indicando menor reclutamiento y activación de macrófagos (Fig. 7A). La infiltración y activación de células dendríticas se suprimía también por citoblastos placentarios, evidenciado por la regulación negativa de la expresión de CD11c, CD80 e IL-12 (Fig. 7B). Además, la infiltración y activación de linfocitos T se suprimía también por citoblastos placentarios, indicado por un expresión reducida de CD3 y CD69 en el grupo tratado con citoblastos placentarios (Fig. 7C). Consistentemente con los resultados de expresión génica anteriores, el análisis de citometría de flujo de una suspensión monocelular del nervio ciático ipsilateral mostró que se detectaba sólo un 1,5 % de las células CD3<sup>+</sup> y un 3,9 % de las células ED2<sup>+</sup> en el grupo tratado con citoblastos placentarios en comparación con el 13,3 % de células CD3<sup>+</sup> y el 8,0 % de ED2 en el grupo de vehículo (Fig. 7D). La tinción con H y E reveló varios edemas epineurales e infiltrados inflamatorios graves en el grupo de vehículo en comparación con los animales normales y tratados con citoblastos placentarios (Fig. 8A-C). Las expresiones de CD68 (Fig. 8D-F), CD8 (Fig. 8G-I) y CD4 (Fig. 8J-L) estaban todas atenuadas en el grupo tratado con citoblastos placentarios en comparación con vehículo.

Además, las quimiocinas, incluyendo CCL2, CCL12 y CXCL1, se suprimían por citoblastos placentarios en el nervio ciático ipsilateral (Fig. 9).

**6.9.2.5** Conclusión

En conclusión, este Ejemplo demuestra que los citoblastos placentarios reducen la alodinia mecánica inducida por inflamación perineural. Además, los citoblastos placentarios suprimen el cebado de linfocitos T y modulan la diferenciación de linfocitos T en nódulos linfáticos de drenaje al inhibir el anidamiento de células dendríticas en nódulos linfáticos y atenuar la activación de células dendríticas.

**6.10 EJEMPLO 10: ATENUACIÓN DE ALODINIA Y RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA ASOCIADAS A INFLAMACIÓN PERINEURAL EN RATAS USANDO CITOBLASTOS PLACENTARIOS**

Este ejemplo demuestra que los citoblastos placentarios pueden reducir el dolor neuropático.

**6.10.1** Materiales y métodos**6.10.1.1** Animales y procedimiento quirúrgico

Se incluyeron en el estudio 77 ratas Sprague Dawley macho de 3 meses de edad y aproximadamente 200-250 g al inicio del estudio. Los pesos mínimo y máximo del grupo estaban dentro del intervalo de ± 20 % del peso medio del grupo. Después de varios días de aclimatación, las ratas experimentaron medidas basales para el comportamiento de dolor (alodinia táctil) y valoración sensorial motora (prueba de Rotarod). Todas las ratas experimentaron lesión por constricción crónica del nervio ciático (CCI); se verificó el desarrollo de dolor el 6º día después de la operación y el comportamiento motor sensorial el 7º día. El 8º día después del procedimiento, se asignaron aleatoriamente las ratas a los diversos grupos de tratamiento (Tabla 5). Se valoraron los niveles de dolor los días 6º, 10º, 16º, 25º y 30º después del procedimiento. Se valoró la coordinación sensorial motora los días 11º, 21º, 26º y 34º. El día 35º, se sacrificaron las ratas, se recogieron los nervios ciáticos (de ambos lados) y se embebieron en parafina. Bazo y nódulos linfáticos experimentaron congelación instantánea y se recogió la cantidad máxima de sangre procesada a plasma.

Para los procedimientos quirúrgicos, se anestesiaron las ratas con solución de ketamina (50 mg/kg) y xilazina (7,5 mg/kg) que se administró IP. Después de la verificación de la anestesia, se afeitó el área de cirugía y se esterilizó posteriormente con Betadine y toallita de alcohol. Se lubricaron los ojos de las ratas.

Tabla 5. Grupos de tratamiento, volumen administrado y número de ratas en cada grupo. PSC designa citoblastos placentarios; GBP designa gabapentina.

Grupo	Tratamiento	Volumen	N
1	Vehículo iv	1,00 cm <sup>3</sup>	10
2	PSC 4 x 10 <sup>6</sup> iv	1,00 cm <sup>3</sup>	10
3	PSC 1 x 10 <sup>6</sup> iv	1,00 cm <sup>3</sup>	9
4	Vehículo im	0,25 cm <sup>3</sup>	10
5	PSC 4 x10 <sup>5</sup> im	0,25 cm <sup>3</sup>	10

6	PSC 4 x 10 <sup>4</sup> im	0,25 cm <sup>3</sup>	10
7	GBP 100 mg/ml ip	0,25 cm <sup>3</sup>	9
8	PBS (vehículo para GBP) ip	0,25 cm <sup>3</sup>	9

**6.10.1.2** Citoblastos placentarios

Se prepararon citoblastos placentarios CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> como se describe en el Ejemplo 7.

**6.10.1.3** Lesión por constricción crónica

5 Se efectuó la cirugía como se describe anteriormente (véase Bennett y Xie, Pain, 1988,33: 87-107). Brevemente, se expuso el nervio ciático a nivel de mitad de muslo por disección roma a través del bíceps femoral y se separó suavemente del tejido adyacente. Proximal a la trifurcación ciática, se liberó suavemente el nervio de tejido adherente durante aproximadamente 7 mm y se ataron 3 ligaduras holgadas (tripa crómica 4/0) alrededor del mismo con un intervalo de 1,0-1,5 mm entre cada una. Se ataron las ligaduras de tal modo que el nervio estuviera apenas oprimido, y no se detuvo la circulación a través de los vasos epineurales superficiales. Se cerró la incisión en capas usando suturas de Vicryl 3/0 para el músculo y grapas de herida para la piel.

**6.10.1.4** Prueba de comportamiento

15 Se evaluó el nivel de dolor usando una prueba de alodinia táctica. En esta prueba, se mide la respuesta de retirada a fibras de von Frey calibradas. Se emplearon en este estudio tres fibras según la aplicación de fuerza baja (8 g), media (16 g) y alta (26 g). Se aplicó cada fibra a la zarpa cinco veces y se calculó la puntuación porcentual de respuestas (véase Flatters et al., Pain, 2004,109: 150-161). La puntuación más fiable y repetible en los valores basales fue la respuesta a 26 g; por lo tanto, se efectuó el análisis estadístico en los datos de 26 g.

20 Se evaluó la coordinación sensorial motora con la prueba Rotarod. En esta prueba, se dispone en roedor sobre un rodillo giratorio y se aumenta gradualmente la velocidad de rotación. Se registra la capacidad del roedor de permanecer sobre el rodillo giratorio (tiempo en segundos). La velocidad usada era de 4-40 rpm (máx. 180 s), con una altura de caída de menos de 30 cm. El fin de la prueba de Rotarod es valorar la coordinación sensorial motora del roedor. La prueba es sensible a fármacos que afectan a la función motora y ayuda a valorar el efecto sedante de una medicación.

**6.10.1.5** Gabapentina

25 Se preparó gabapentina en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La dosis usada era 100 mg/ml y se inyectaron 0,25 ml en las ratas de 250 g por vía intraperitoneal (IP). Se inyectó el mismo volumen de PBS en el grupo de control IP.

**6.10.1.6** Análisis de datos

30 Se tabularon los datos y se analizaron usando el software StatView versión 5.0 (SAS Institute Inc., San Francisco, California, EE. UU.). Se establecieron los alfa (de dos colas) para significación en todos los análisis en 0,05. Se calcularon las estadísticas de comportamiento solo para ratas con datos en todos los puntos temporales. Se usó un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) seguido de prueba post hoc para las puntuaciones de dolor y coordinación sensorial motora. Se verificó el desarrollo de dolor por comparación con los niveles basales. Se realizó el efecto sobre el dolor por comparación con el nivel de dolor el día 6° después del procedimiento.

**6.10.2** Resultados

35 **6.10.2.1** Comportamiento de dolor- alodinia táctil

Como se demostró en la Fig. 10, 6 días después del procedimiento se demostró un aumento significativo de las respuestas (indicando dolor) en todos los grupos.

40 La administración intramuscular (IM) de 4 x 10<sup>4</sup> citoblastos placentarios reducía significativamente el dolor durante la duración del estudio los días 10, 16, 25 y 30 (Fig. 10C). La administración intravenosa (IV) de citoblastos placentarios reducía significativamente el dolor. En particular, la administración IV de 4 x 10<sup>6</sup> citoblastos placentarios reducía significativamente el dolor los días 16, 25 y 30; y la administración IV de citoblastos placentarios a 1 x 10<sup>6</sup> demostraba un efecto de reducción del dolor significativo el día 16 (Fig. 10A). Como se esperaba, la administración sistémica de gabapentina reducía significativamente el dolor los días 10, 16, 25 y 30 (Fig. 10A, 10C).

**6.10.2.2** Coordinación sensorial motora- prueba de Rotarod

45 Como se demostró en la Fig. 11, el grupo de control tratado con gabapentina demostró un reducción significativa del tiempo pasado en el Rotarod (coordinación sensorial motora alterada), mientras que la coordinación sensorial motora

del grupo tratado con citoblastos placentarios no estaba afectada (de forma similar al grupo tratado con vehículo) después de la administración IV (Fig. 11A) o IM (Fig. 11B).

**6.10.2.3**            Conclusión

5    La administración IV o IM de citoblastos placentarios reduce el dolor neuropático inducido por lesión de constricción crónica del nervio ciático. El efecto de los citoblastos placentarios sobre el dolor era similar al de gabapentina. Sin embargo, mientras que la gabapentina inducía una deficiencia de coordinación sensorial motora significativa, los citoblastos no.

**Equivalentes:**

10    Las composiciones y métodos divulgados en la presente memoria no han de estar limitados en alcance por las diversas realizaciones descritas en la presente memoria.

## REIVINDICACIONES

1. Citoblastos placentarios para uso en un método de tratamiento de dolor neuropático causado por neuropatía diabética en un individuo, en los que los citoblastos placentarios son citoblastos placentarios CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>.
- 5 2. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 1, en los que dicho método comprende adicionalmente determinar uno o más primeros niveles de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichos citoblastos placentarios, y determinar uno o más segundos niveles de dolor en dicho individuo después de la administración de dichos citoblastos placentarios, en los que dichos citoblastos placentarios reducen dichos uno o más segundos niveles de dicho dolor en comparación con dichos uno o más primeros niveles de dolor.
- 10 3. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 2, en los que dichos uno o más primeros niveles de dolor y dichos uno o más segundos niveles de dolor se determinan mediante una escala de valoración del dolor.
- 15 4. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 3, en los que dicha escala de valoración del dolor es la escala numérica de intensidad del dolor, la escala analógica visual, la escala de clasificación del dolor FACES de Wong-Baker, la escala FLACC, la escala CRIES, la escala COMFORT o la medida del dolor evocado inducido al someter al paciente a estímulos fríos, calientes o mecánicos.
- 20 5. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 1, en los que dicho método comprende adicionalmente determinar un primer nivel de uno o más indicios fisiológicos de dolor en dicho individuo antes de la administración de dichos citoblastos placentarios, y determinar un segundo nivel de uno o más indicios fisiológicos de dolor en dicho individuo después de la administración de dichos citoblastos placentarios, en los que dichos citoblastos placentarios reducen dicho segundo nivel en comparación con dicho primer nivel.
- 25 6. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 5, en los que dicho indicio fisiológico de dolor es:
- (i) ritmo cardiaco en el individuo;
  - (ii) la presión sistólica de dicho individuo; o
  - (iii) la presión diastólica de dicho individuo.
- 30 7. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 1, en los que dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>+</sup>.
8. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 1 o 7, en los que dichos citoblastos placentarios son adicionalmente CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>.
9. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 1, en los que dichos citoblastos placentarios no expresan HLA-G; o expresan CD73; o expresan OCT-4; o expresan CD73 y no expresan HLA-G.
- 35 10. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 1, 7 u 8, en los que dichos citoblastos placentarios son HLA-A,B,C<sup>+</sup>.
11. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 1, en los que dichos citoblastos placentarios expresan el gen ELOVL2, ST3GAL6, ST6GALNAC5 o SLC12A8 a un nivel detectablemente mayor que un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea.
- 40 12. Los citoblastos placentarios para uso de la reivindicación 11, en los que dichos citoblastos placentarios expresan el gen ARTS-1, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 o TGFB2 a un nivel detectablemente mayor que un número equivalente de citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea.
13. Los citoblastos placentarios para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en los que dicho dolor es insensible a:
- (i) terapia de esteroides;
  - (ii) terapia antiinflamatoria no esteroidea;
  - (iii) terapia opioidea; o
  - (iv) terapia opiácea.
- 45 14. Los citoblastos placentarios para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en los que dichos citoblastos placentarios se formulan para administrarse por vía local, sistémica, intravenosa o intraarterial.

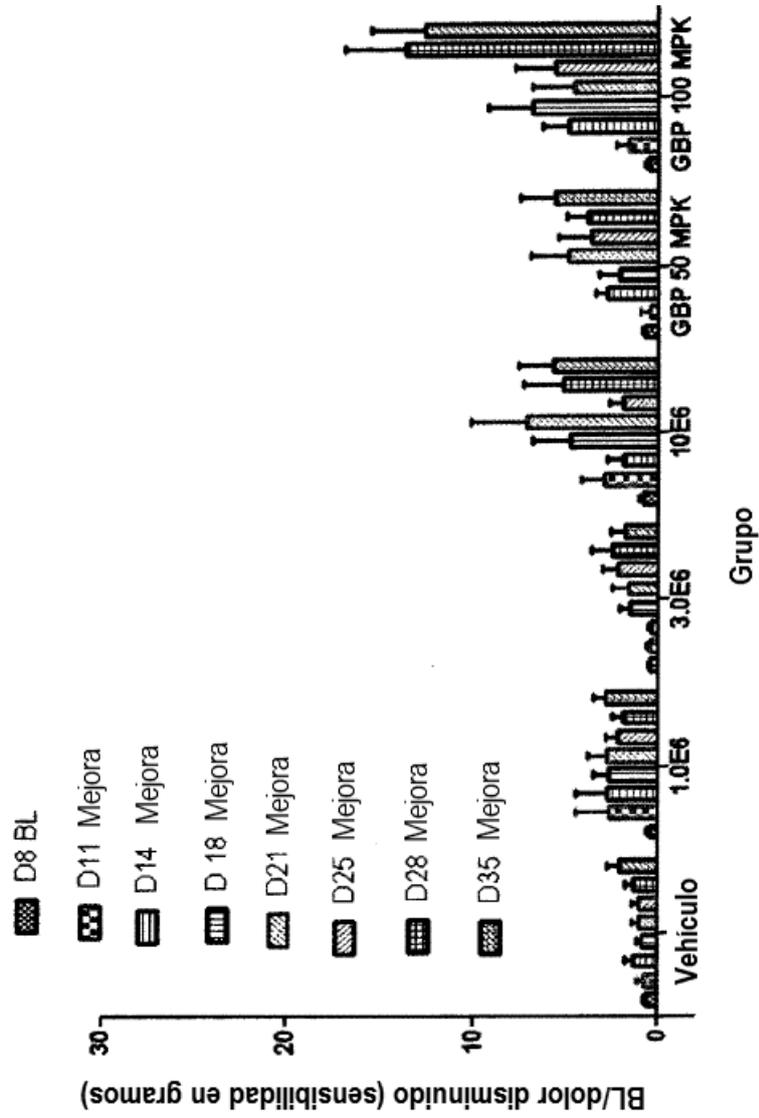


Fig. 1

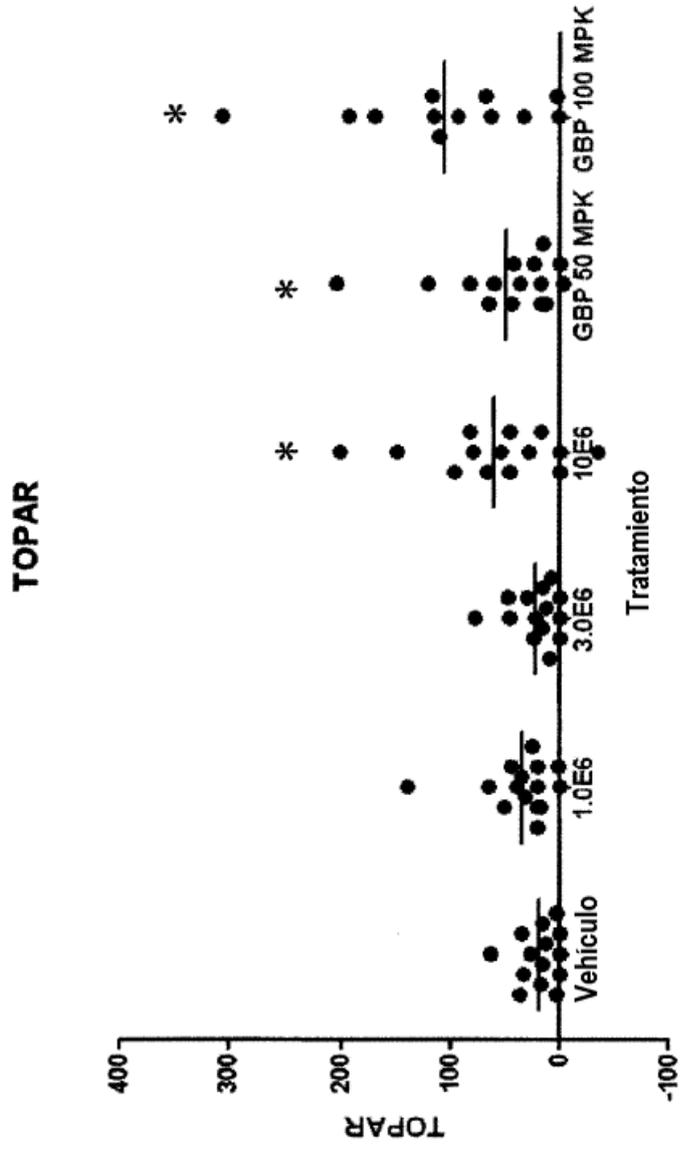


Fig. 2

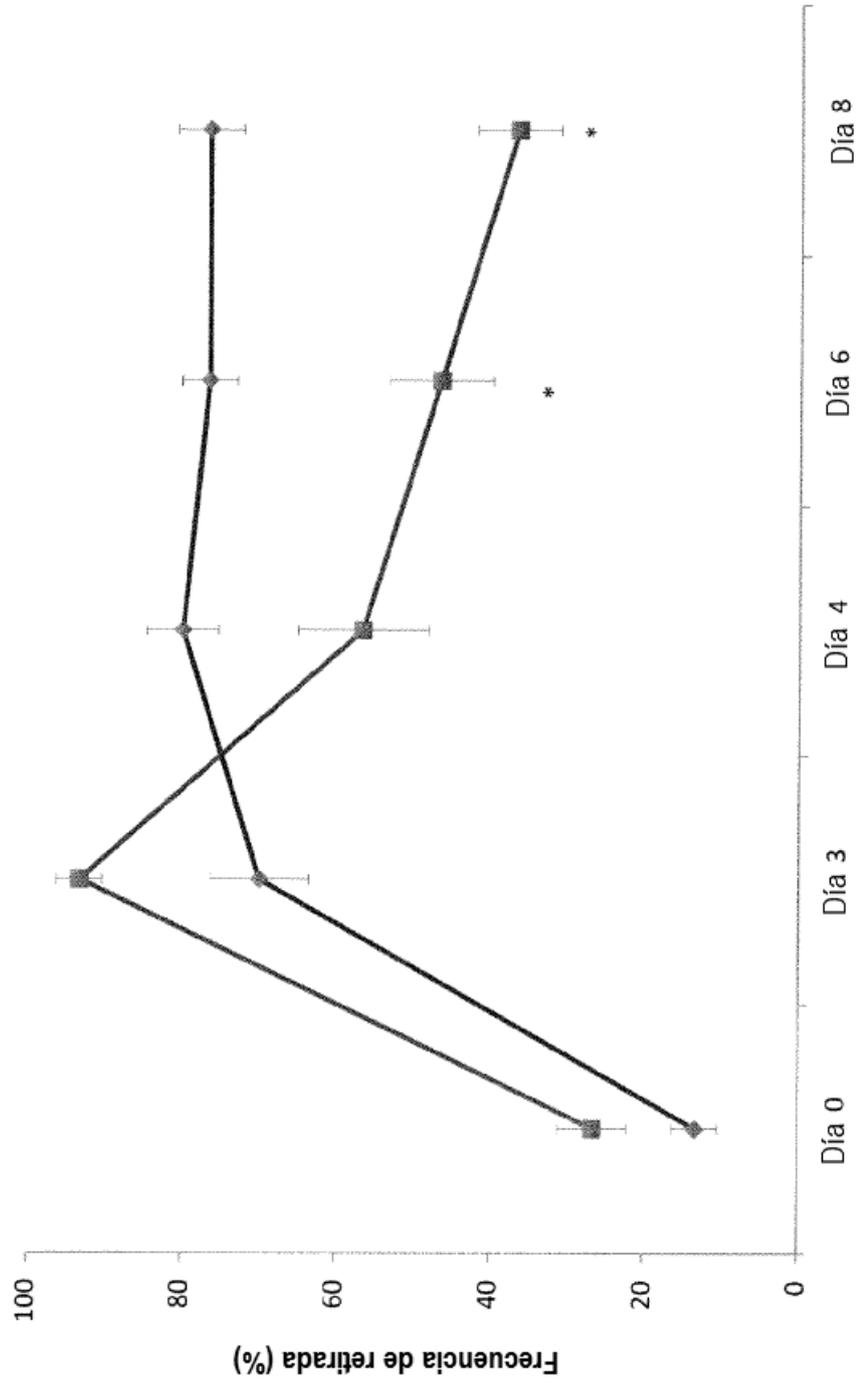


FIG. 3A

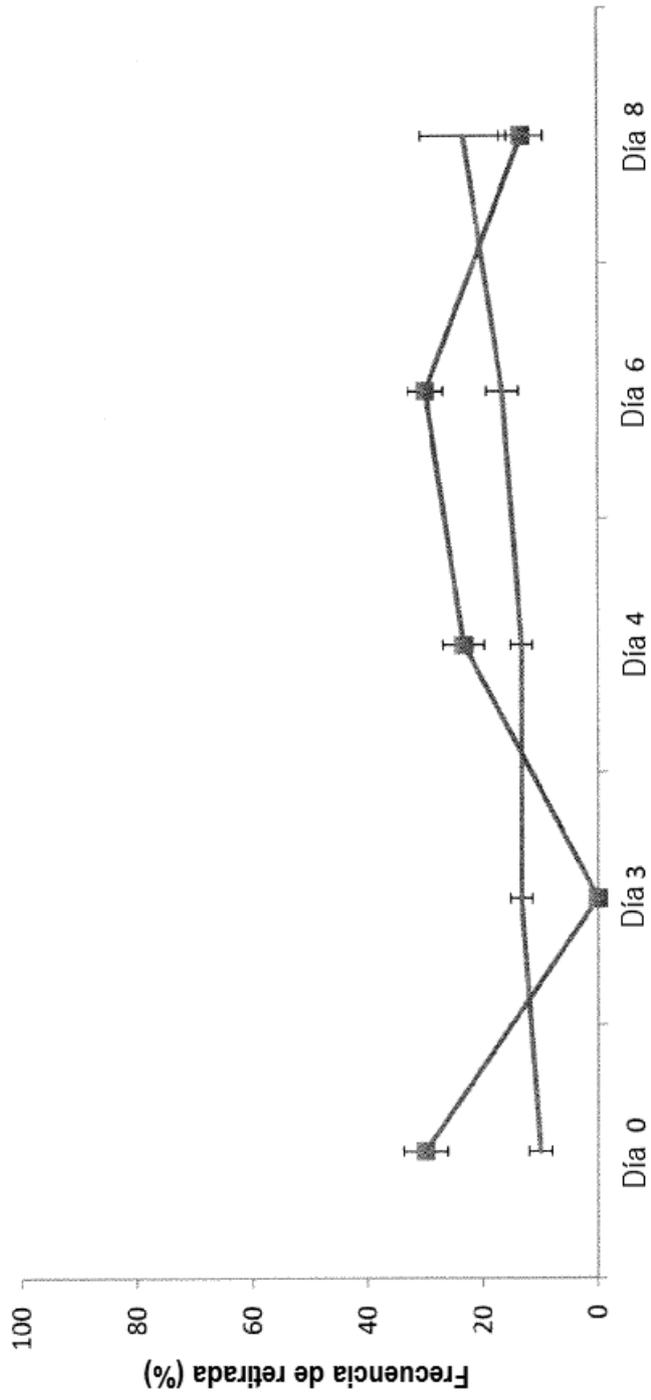


FIG. 3B

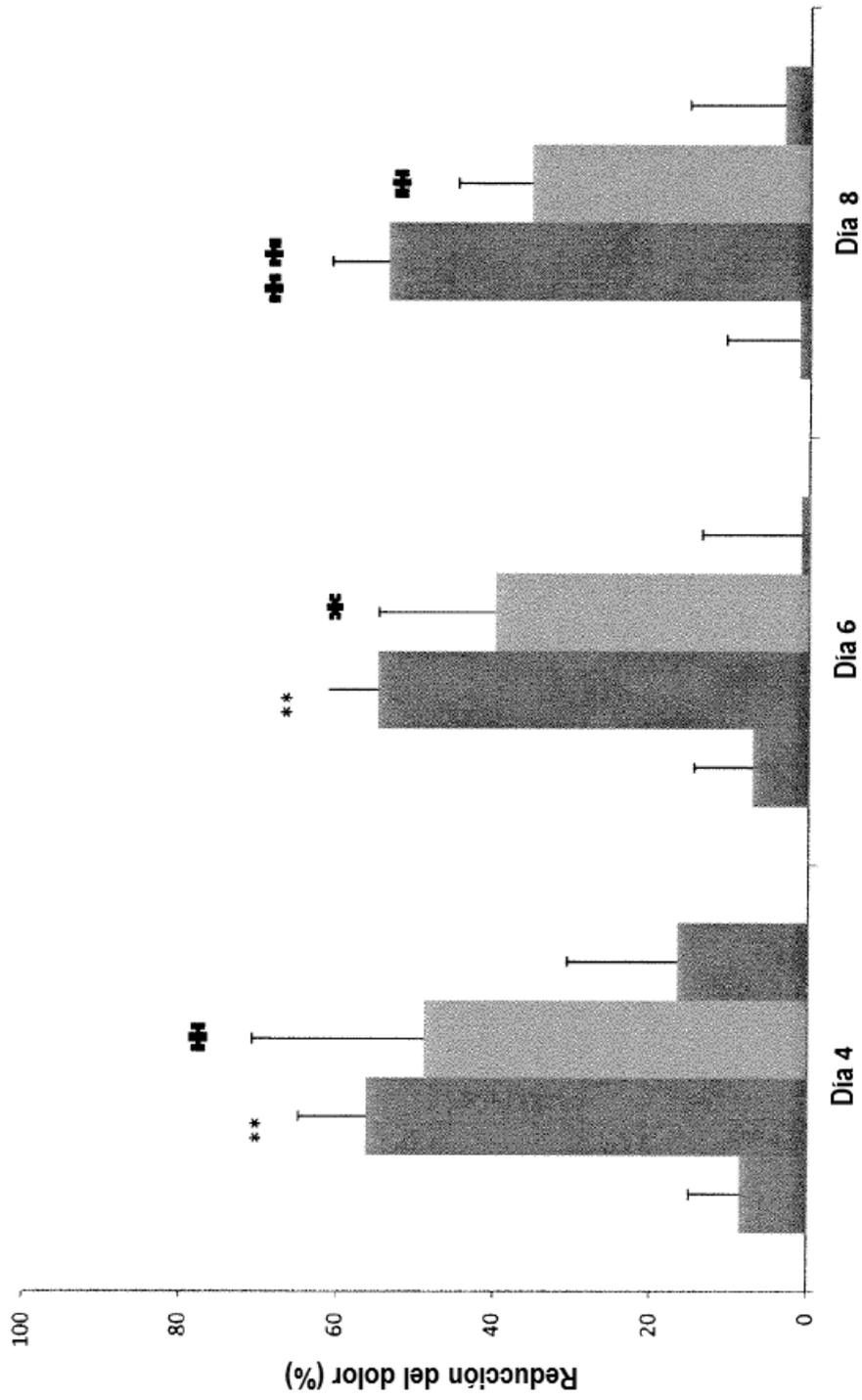


FIG. 3C

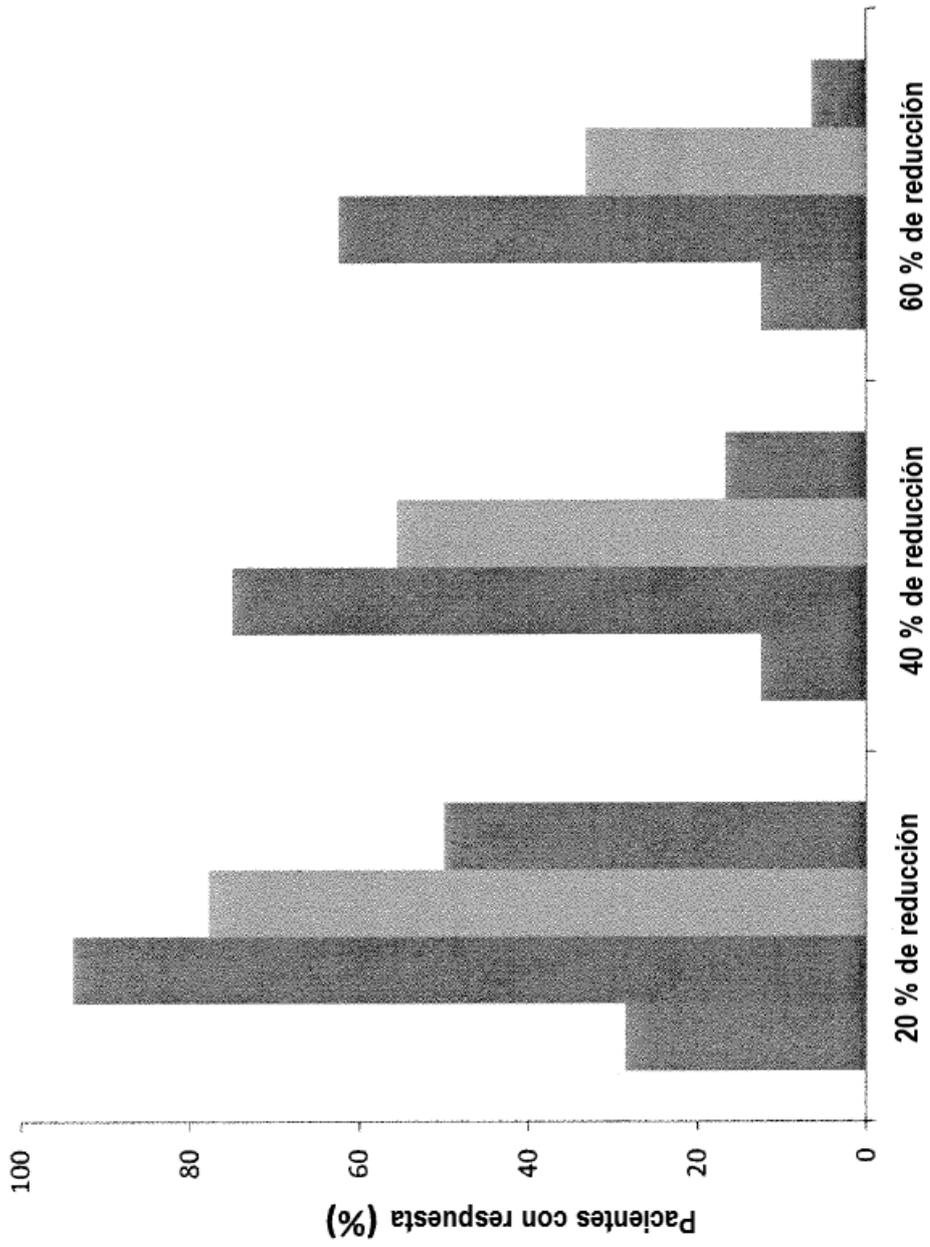


FIG. 3D

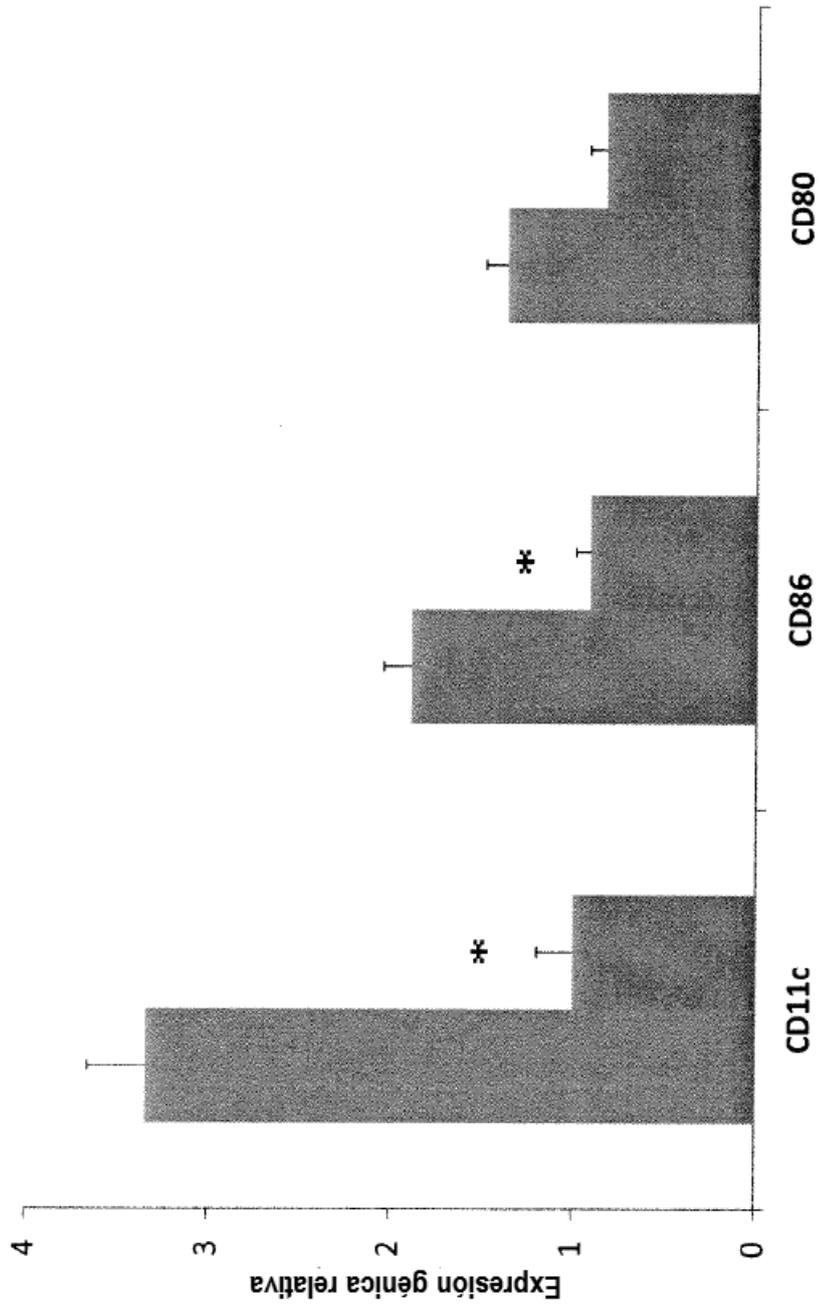


FIG. 4A

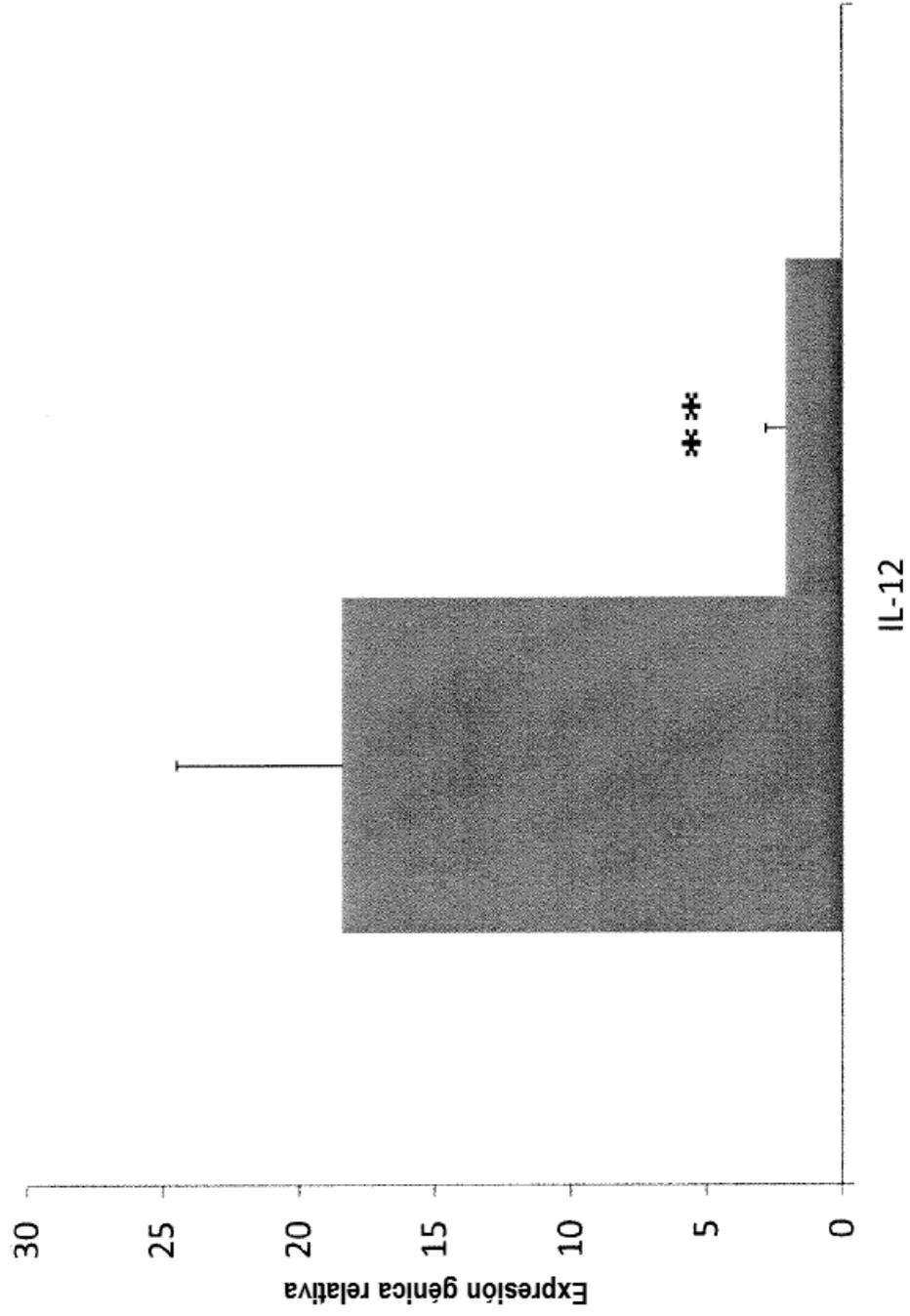


FIG. 4B

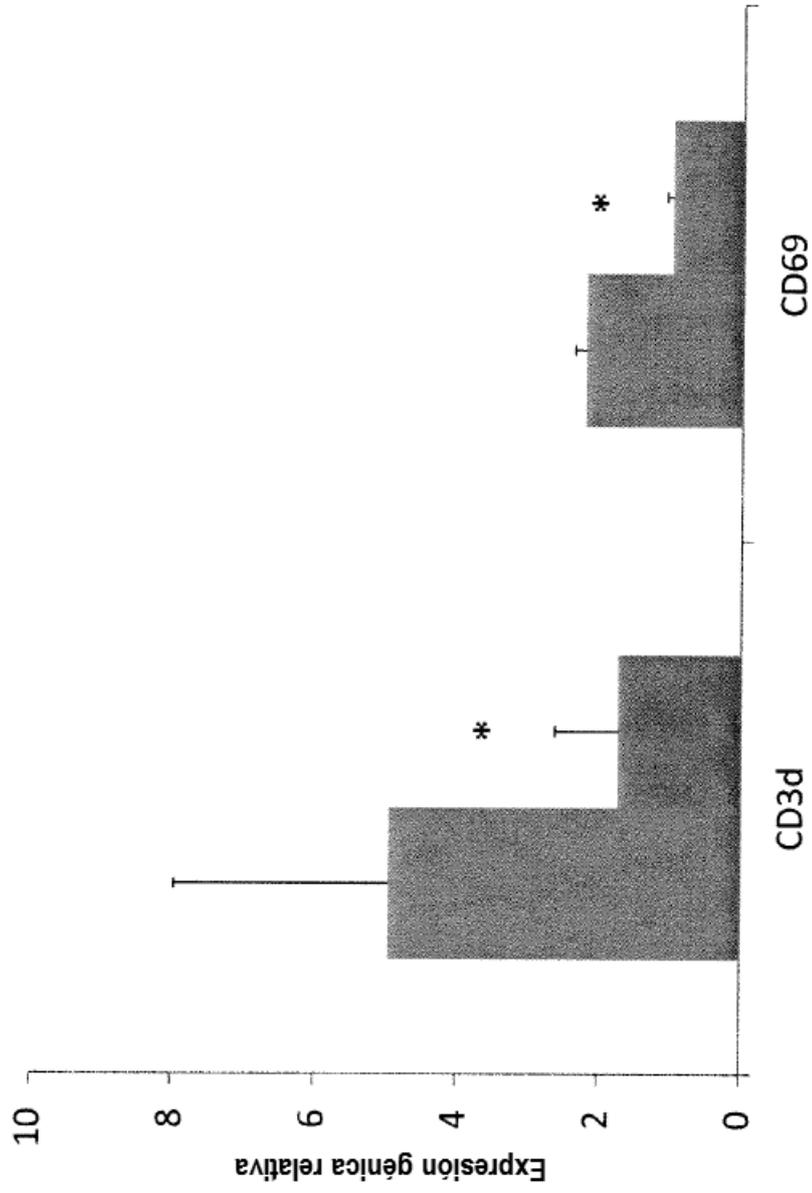


FIG. 5A

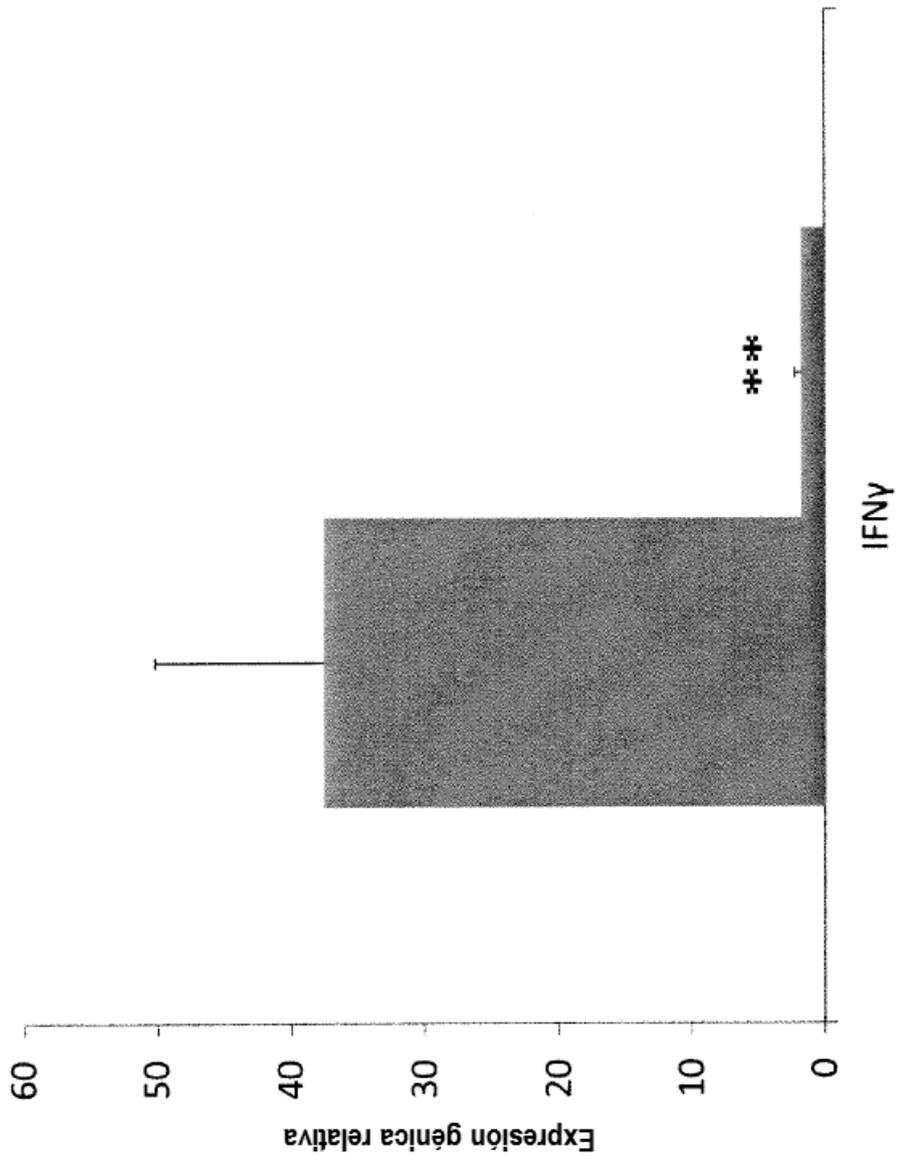


FIG. 5B

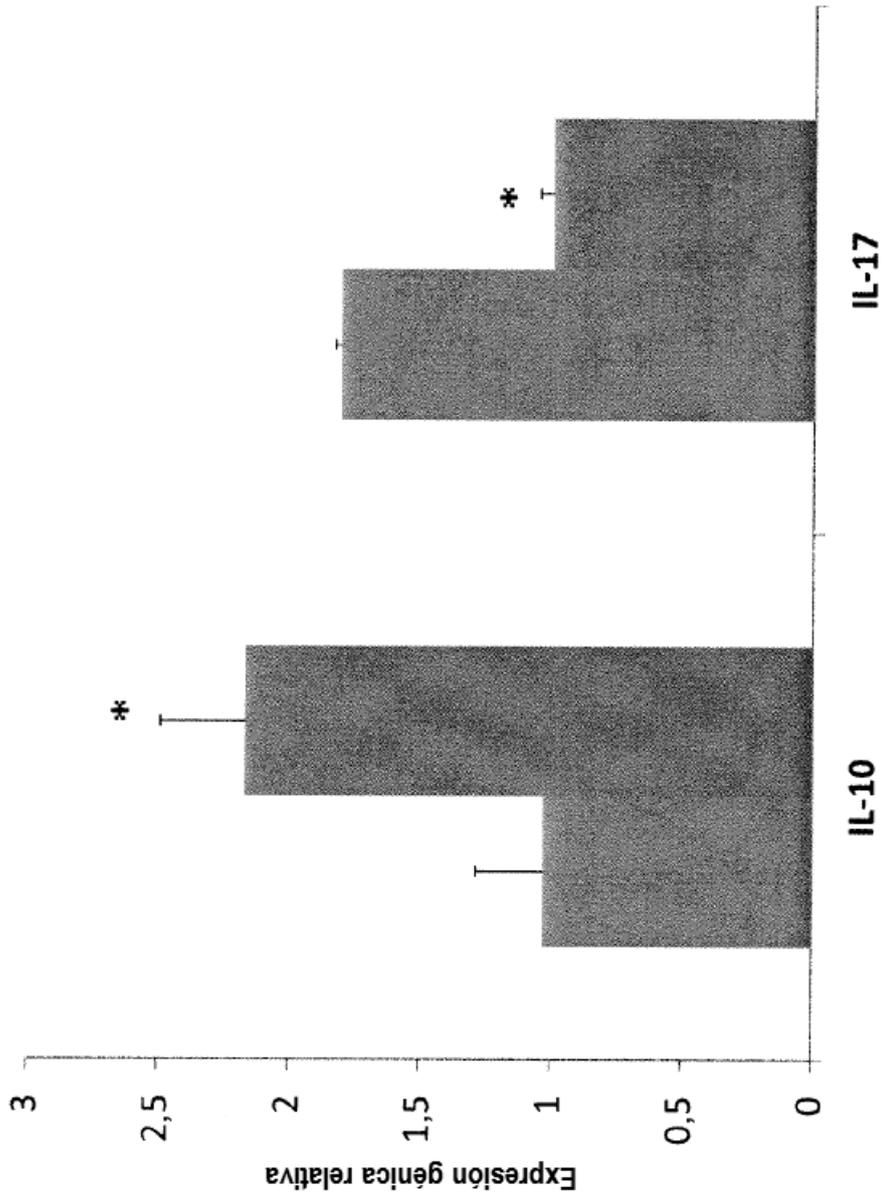


FIG. 5C

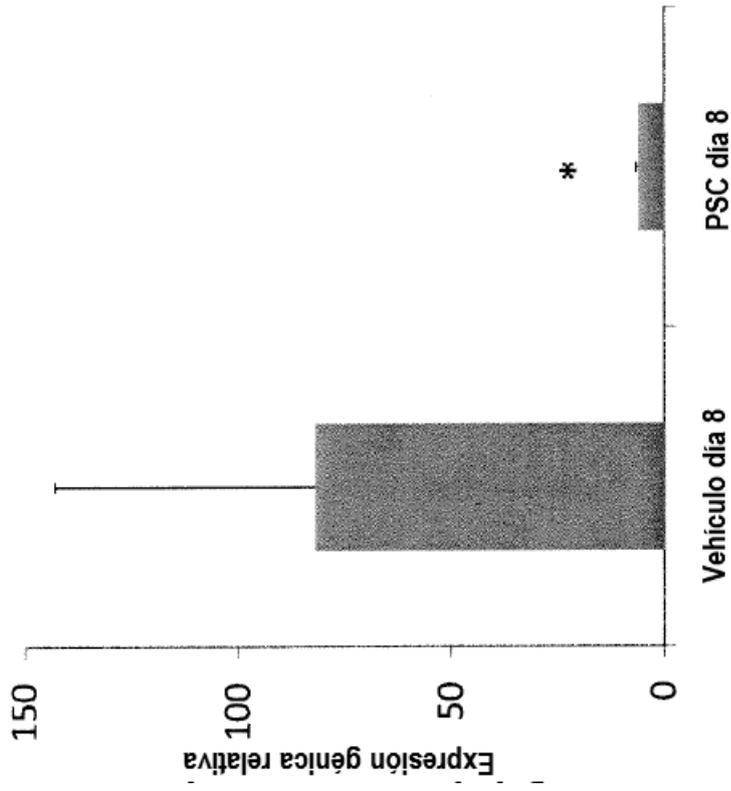


FIG. 6A

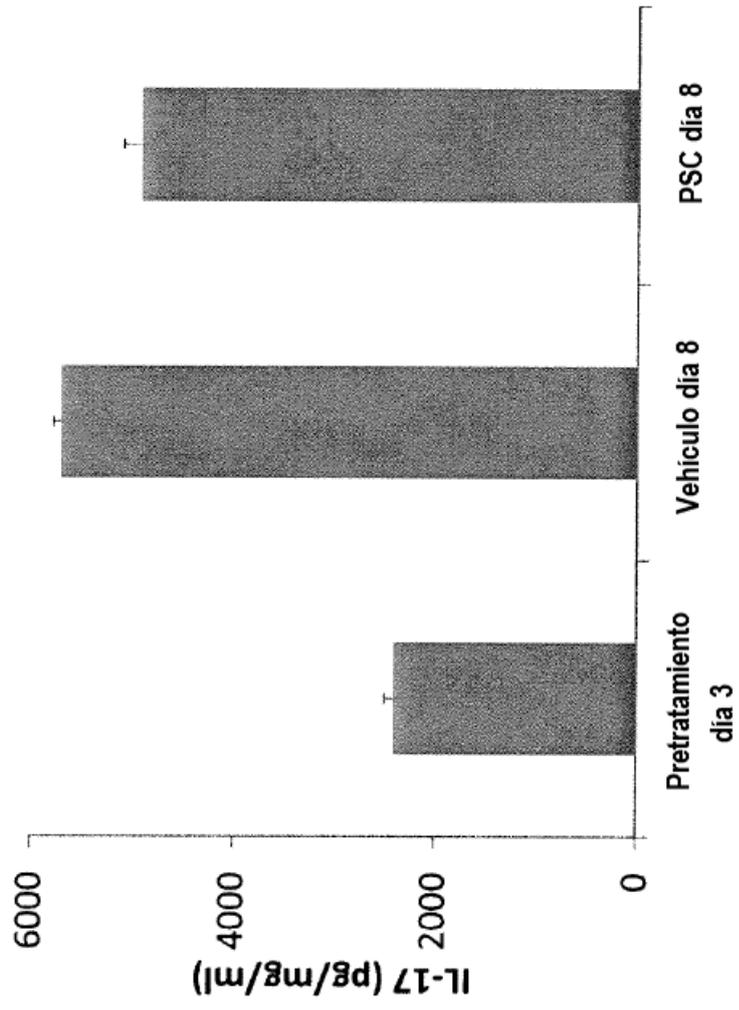


FIG. 6B

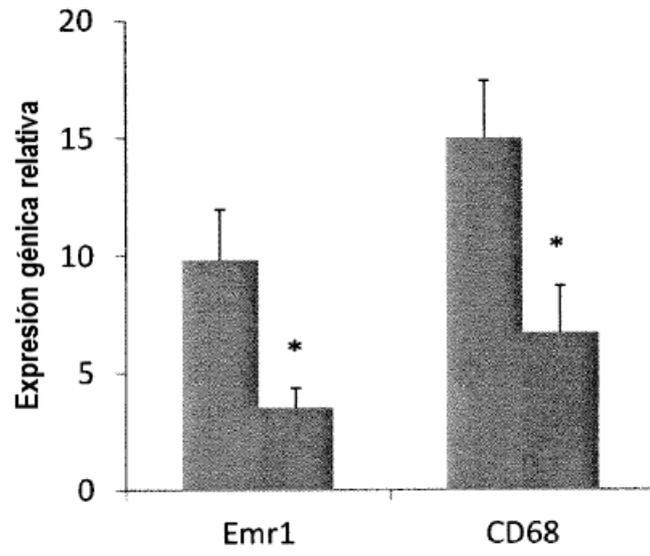


FIG. 7A

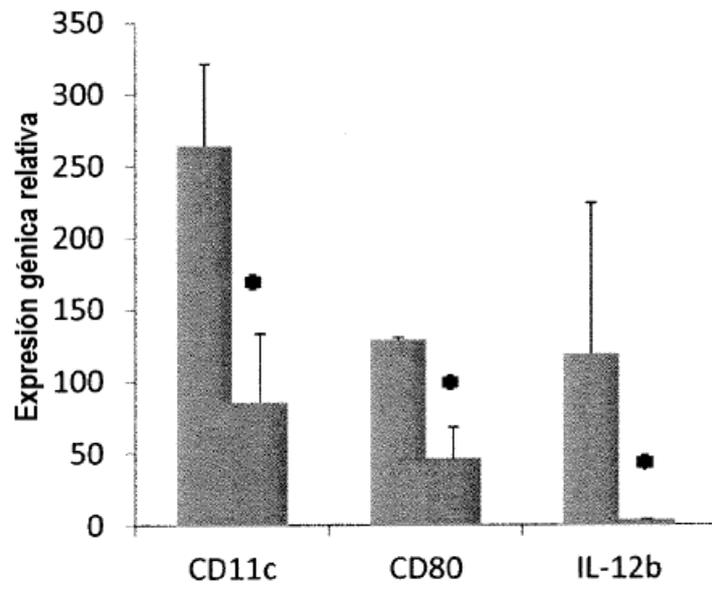


FIG. 7B

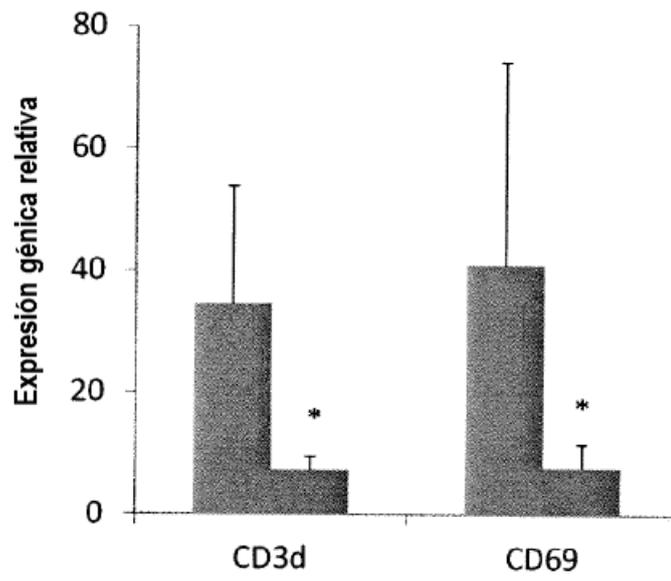


FIG. 7C

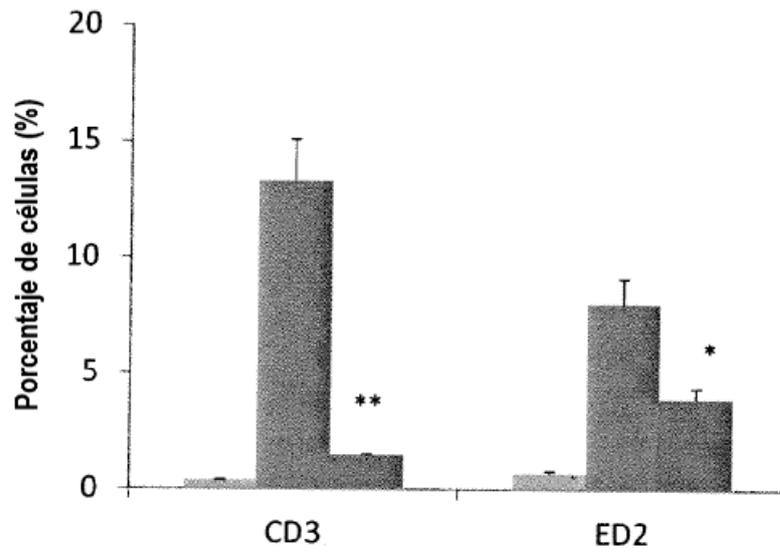


FIG. 7D

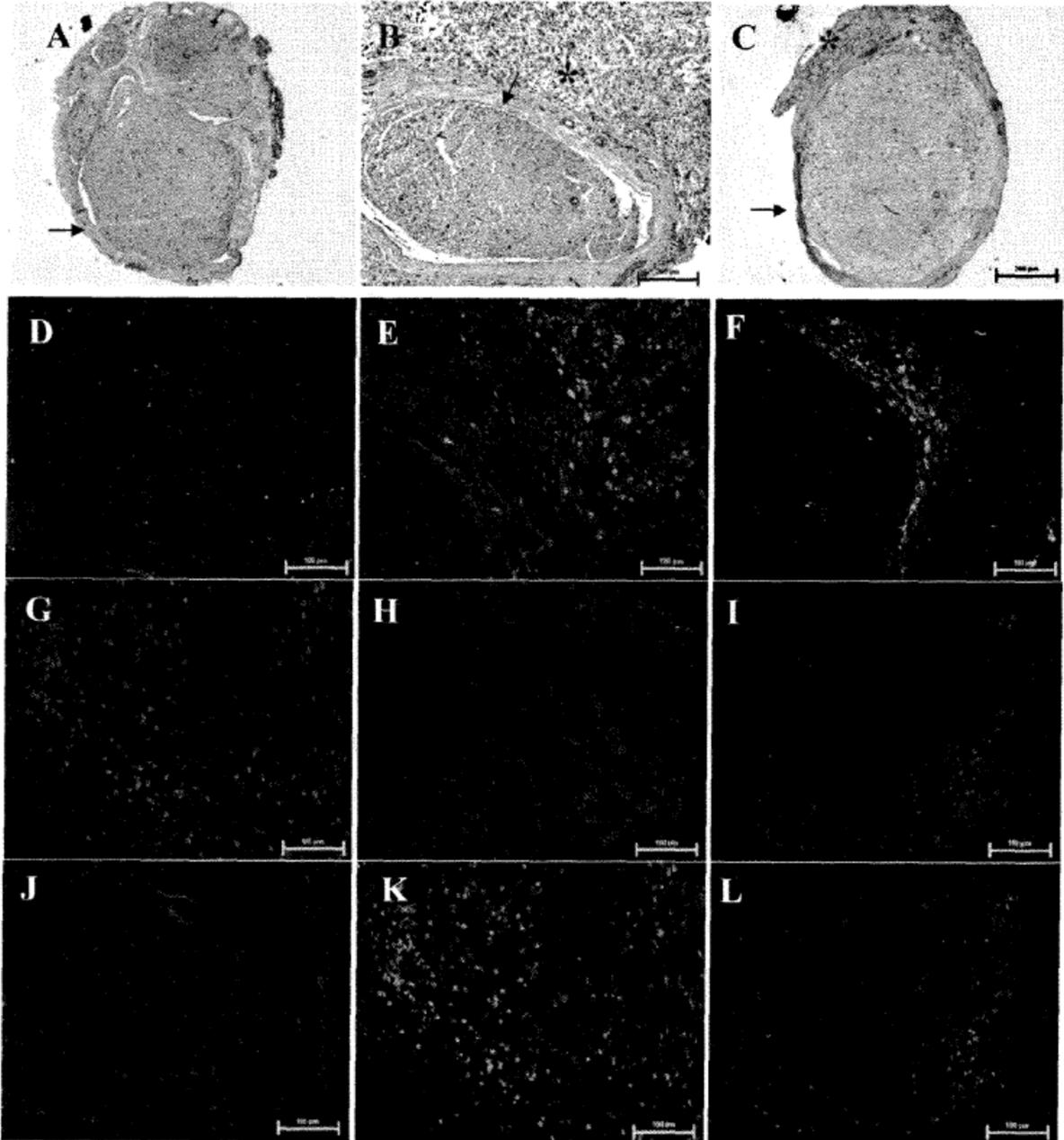


FIG. 8A-L

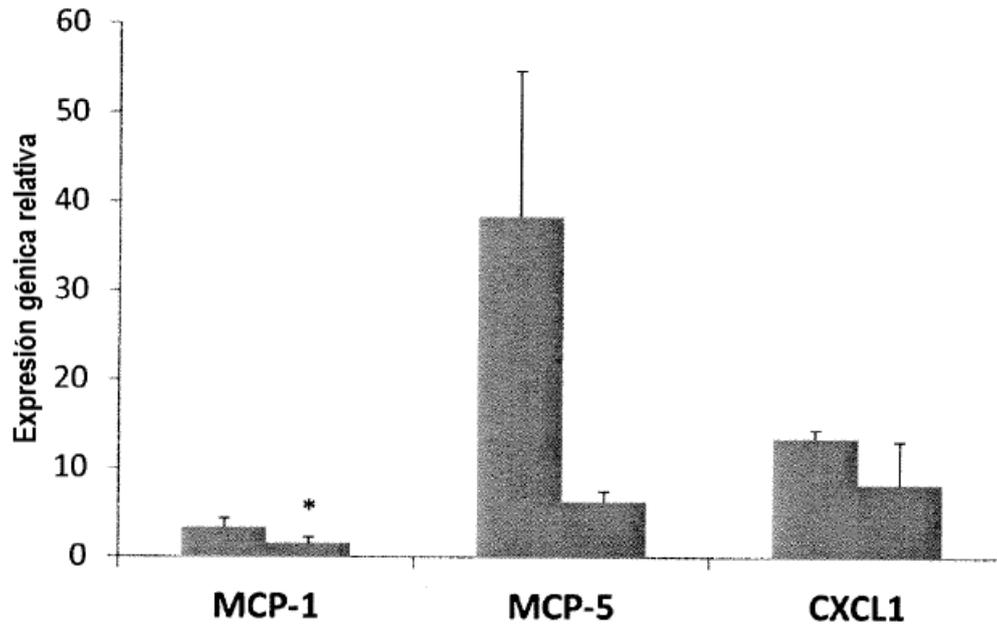


FIG. 9

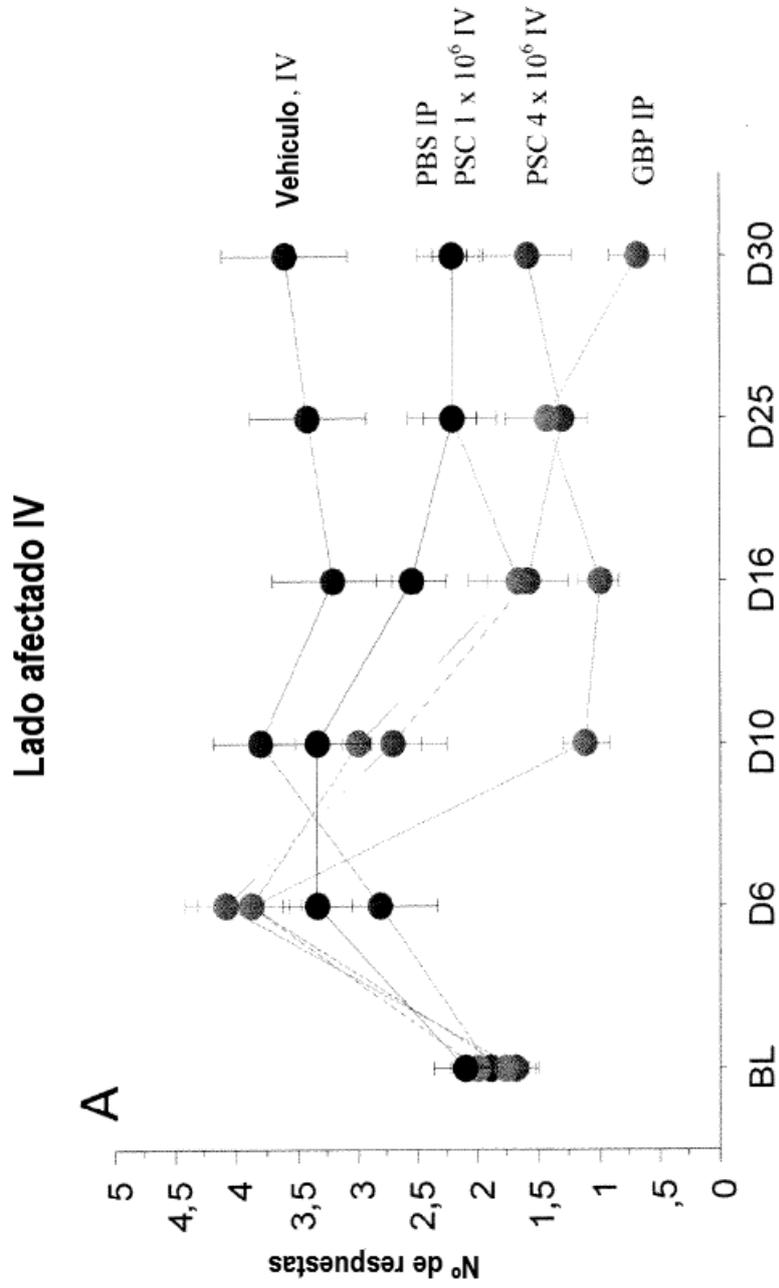


FIG. 10A

# Contralateral IV

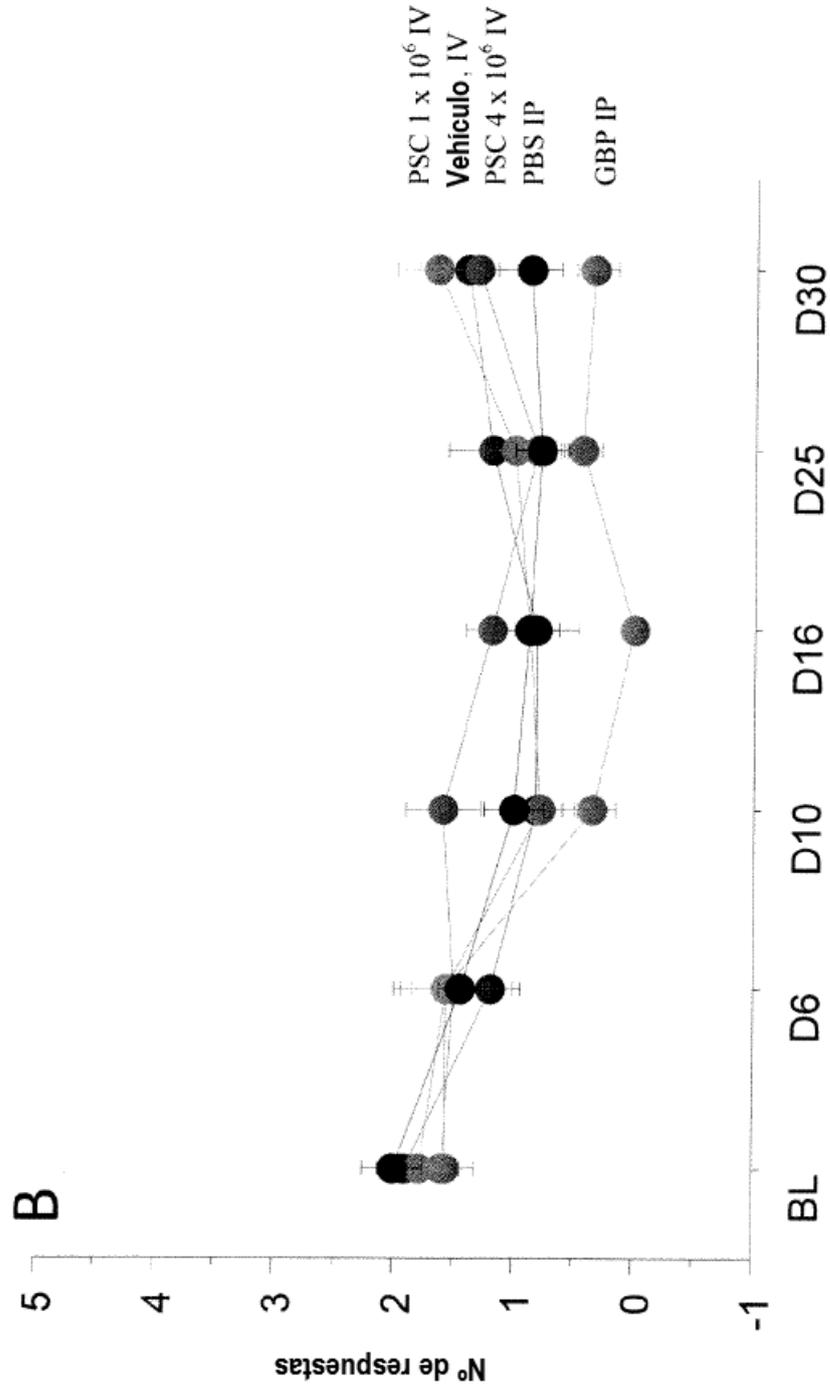


FIG. 10B

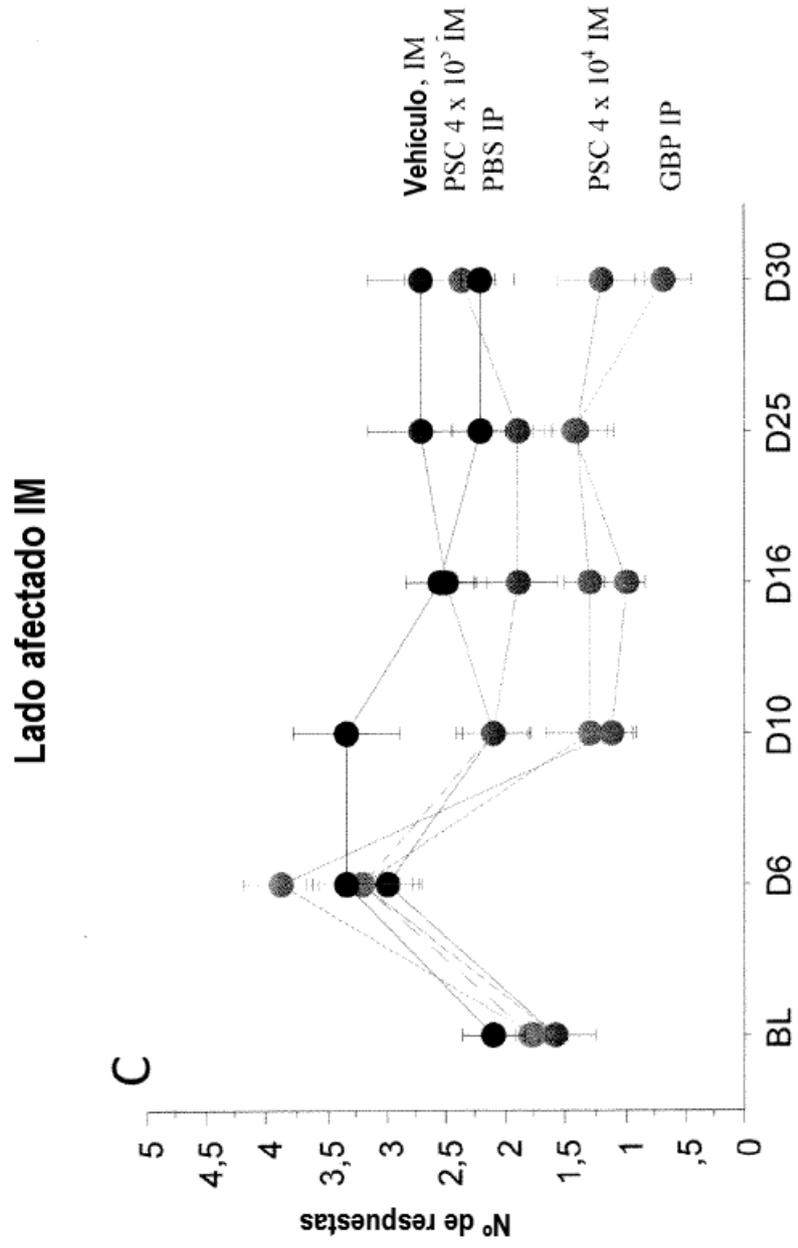


FIG. 10C

# Contralateral IM

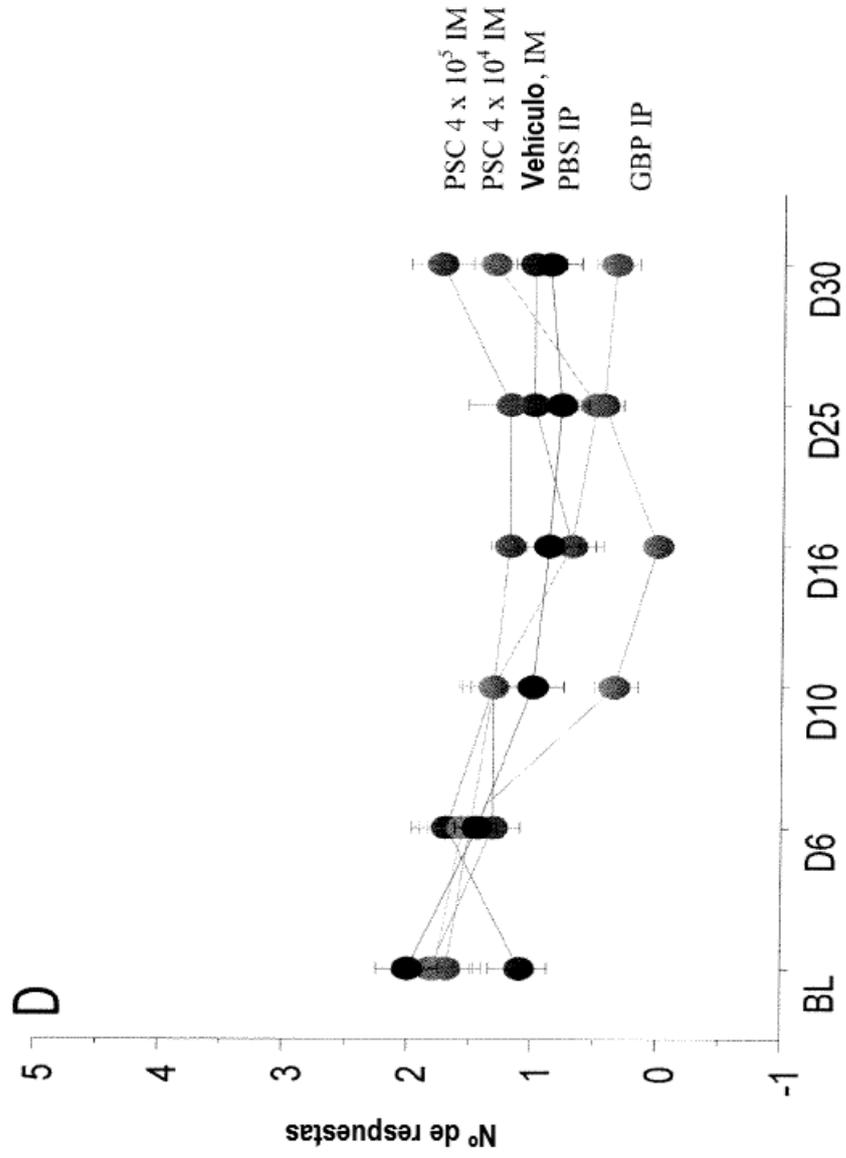


FIG. 10D

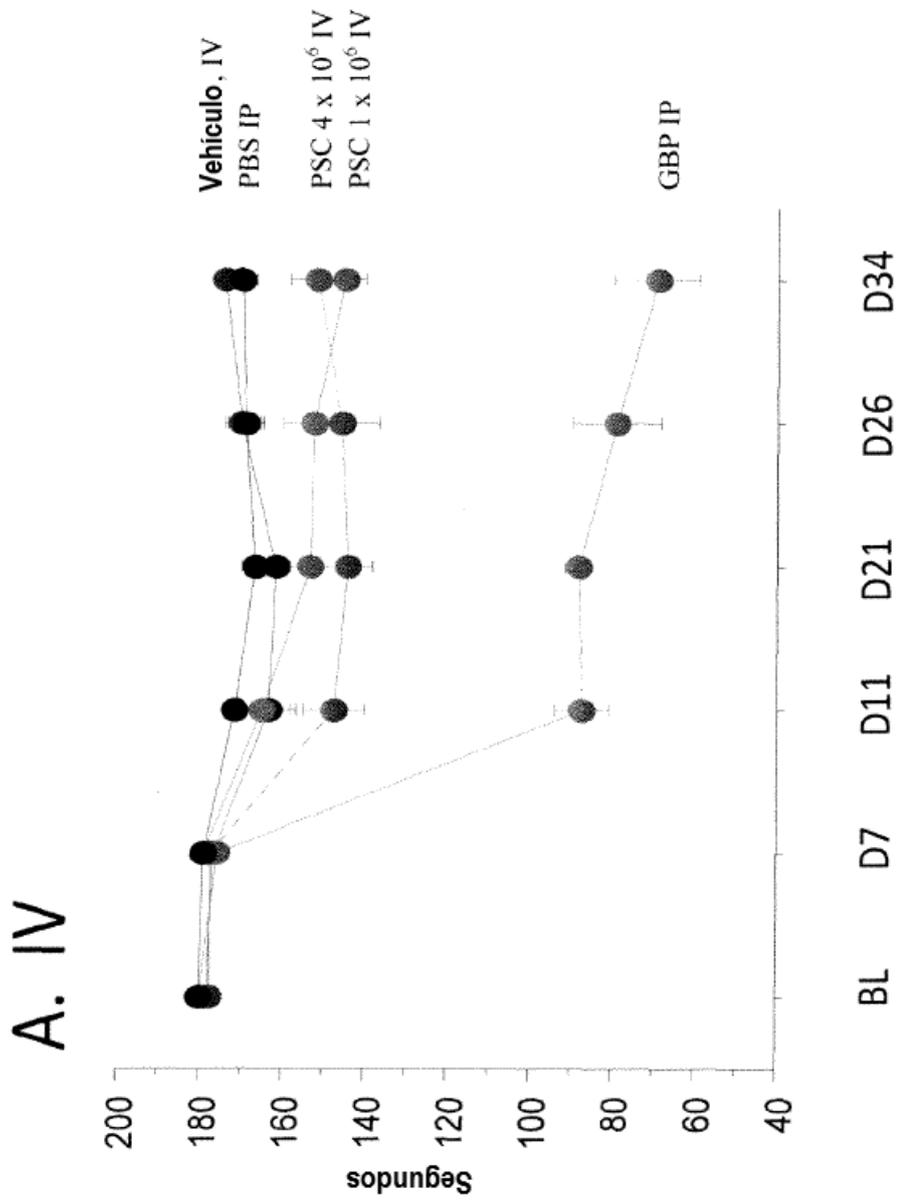


FIG. 11A

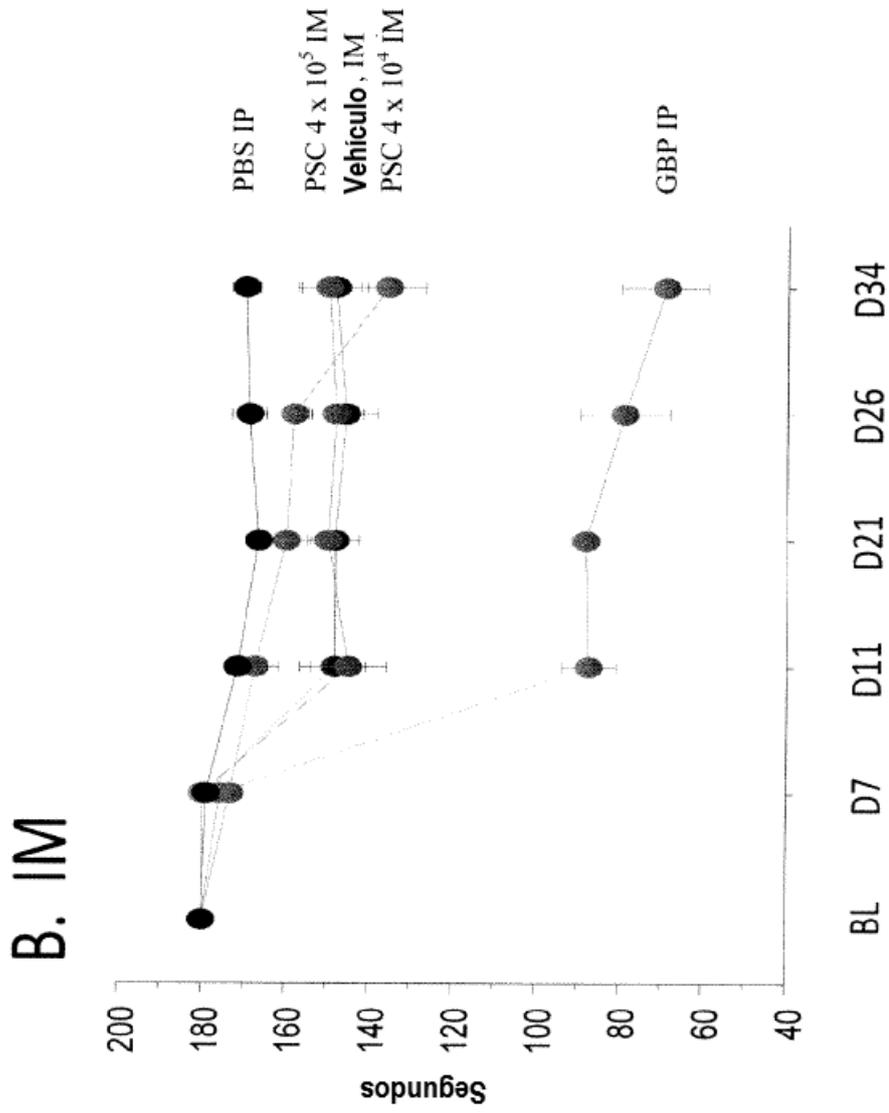


FIG. 11B