

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 546**

51 Int. Cl.:
A61K 35/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07731481 .3**
96 Fecha de presentación: **18.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2040719**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Utilización de células derivadas del tejido adiposo para la preparación de un medicamento antitumoral**

30 Prioridad:
18.05.2006 FR 0604443

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.06.2012

73 Titular/es:
**Centre National de la Recherche Scientifique
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR;
UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III y
Institut National De La Sante Et De La Recherche
Medicale**

72 Inventor/es:
**CORDELIER, Pierre;
BUSCAIL, Louis;
CASTEILLA, Louis;
COUSIN-DELARUE, Béatrice;
PENICAUD, Luc y
PERON, Jean-Marie**

74 Agente/Representante:
Aznárez Urbieta, Pablo

ES 2 383 546 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

Utilización de células derivadas del tejido adiposo para la preparación de un medicamento antitumoral.

La presente invención se refiere a la utilización de células derivadas del tejido adiposo para la preparación de un medicamento con acción antitumoral.

5 El tratamiento eficaz del cáncer continúa siendo uno de los mayores desafíos de la medicina hoy en día. La eficacia de las terapéuticas convencionales quirúrgicas o con alcance citolítico (quimioterapia y radioterapia) sigue siendo muy limitada en numerosos cánceres. En efecto, ciertos cánceres muy frecuentes (tracto gastrointestinal, en particular), son siempre difíciles de tratar teniendo en cuenta su aspecto masivo que se opone a la difusión de los agentes terapéuticos. Su tratamiento requiere entonces en primer lugar la exéresis quirúrgica, seguida de una quimioterapia eventualmente asociada a una radioterapia. No obstante, en los casos en que la cirugía es imposible o ya no es posible, una quimioterapia alternativa y eficaz sin ser tóxica resulta necesaria. No obstante, los productos disponibles presentan una eficacia limitada o una toxicidad inaceptable. Existe entonces una necesidad de nuevos tratamientos anti-cancerosos para poder disponer de una gama suficientemente extensa de tratamientos, para incrementar de este modo las posibilidades de cura.

15 En el caso por ejemplo de los cánceres del tracto gastrointestinal (esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, colón) y de sus glándulas anexas (hígado, vesícula biliar, páncreas), la falta de tratamientos se evidencia cuando la exéresis quirúrgica es imposible o ya no es posible. En efecto, los tratamientos existentes que están esencialmente basados en la quimioterapia (5-fluorouracilo o 5-FU, gemcitabina...), y la radioterapia, tienen un bajo impacto en la supervivencia y se utilizan fundamentalmente con fines paliativos, principalmente en los casos de cánceres colorectales, gástricos y pancreáticos (para revista, DIAZ-RUBIO, The Oncologist, 2004, 9, 282-294).

Además de la falta de tratamientos eficaces, la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos habitualmente utilizados (fluoro-uracilo, ácido polínico, derivados del platino, tal como la oxaliplatina, mitomicina C, por ejemplo) y los efectos secundarios asociados a dichos tratamientos representan otro inconveniente mayor.

25 Fueron probados nuevos anticancerígenos, principalmente en los cánceres del tracto gastrointestinal, tales como el pemetrexed (antifolato : agente citotóxico), vacunas, inhibidores de quinasa (briostatina, UCN-01, flavopiridol, CI-1040), inhibidores del EGFR (cetuximab, gefitinib, GW572016, CI-1033, erlotinib) e inhibidores del VEGF (bevacizumab, PTK787/ZK 222584, angiosim, ZD6474).

Por ejemplo:

- 30
 - El cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico relacionado específicamente con el campo extra-celular del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) e inhibe la proliferación de células tumorales que derivan en EGFR e induce una apoptosis.
 - El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 que se asocia al VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e inhibe por lo tanto la unión del VEGF con sus receptores, Flt-1 (VEGFR-1) y Kdr (VEGFR-2), situados en la superficie de la células endoteliales tanto *in vitro* como *in vivo*. Está constituido por una parte constante de origen humano y una parte variable de origen murino.

Los resultados obtenidos con estos nuevos productos solos o en asociación no constituyen ninguna mejora con respecto a los tratamientos anteriores, en particular en el tratamiento de los cánceres del tracto digestivo, tanto desde el punto de vista de la eficacia como de la toxicidad.

40 En el caso del cáncer de páncreas, que representa la quinta causa de fallecimiento por cáncer en los países occidentales, el médico se encuentra aún más desprovisto; además de una agresividad y una revelación clínica a menudo tardía, su pronóstico es muy malo (supervivencia de 5 años inferior a 3.5 %); y además, la exéresis quirúrgica sólo es posible entre el 10 y el 15 % de los casos. La radioterapia o la quimioterapia tienen poco efecto en la prolongación de vida de los pacientes cuyo tumor no ha sido resecado (promedio de supervivencia 5-6 meses) (Safioleas MC y al., Hepatogastroenterology, 2004, 51 (57) : 862-868; Jemal A. y al., CA Cancer J Clin, 2002, 52 (1) : 23-47 ; Rosewicz S., y al., Lancet, 1997, 349 (9050) : 485-489., Jafari M. y al., Surg Oncol Clin N Am, 2004, 13 (4) : 751-760, xi ; Kullke MH y al., Curr Treat Options Oncol, 2002, 3 (6) : 449-457). Los cánceres del páncreas no-resecables, principalmente el cáncer de la cabeza del páncreas, son objeto de derivaciones paliativas, de la utilización de endoprótesis biliares o duodenales, incluso de la alcoholización antálgica del plexo celíaco. La prolongación de la vida de los pacientes sigue siendo muy baja:

- 50
 - En caso de cáncer localmente avanzado no-metastático y no resecable o de cáncer metastático, el tratamiento de referencia actual es la gemcitabina, con la cual se observa una mejoría de los signos clínicos (dolor, trastornos del tránsito) mientras que el pronóstico vital sigue bajo (7 a 10 meses) (Safioleas MC y al., Hepatogastroenterology, 2004, 51 (57): 862-868 ; Jemal A. y Al., CA Cancer J Clin, 2002, 52 (1): 23-47 ; Rosewicz S., y al., Lancet, 1997, 349 (9050) : 485-489., Jafari M. y al., Surg Oncol Clin, 2004, 13 (4) : 751-760, xi ; Kullke MH y al., Curr Treat Options Oncol, 2002, 3(6) : 449-457).

- Una de las vías de investigación para mejorar el pronóstico del cáncer de páncreas es disponer de un tratamiento eficaz aplicable principalmente a los tumores no reseables con el objetivo de reducir la progresión de la enfermedad.

De este modo, se han establecido unos protocolos de investigaciones clínicas que utilizan la terapia génica o la terapia celular:

5
10

- Por ejemplo, MULVIHILL y al. (Gene Therapy, 2001, 8, 308-315) han llevado a cabo ensayos clínicos de fase I, durante los cuales procedieron a la inyección intratumoral, mediante un dispositivo de tomografía asistida por ordenador (CT para “*computed tomography*”), en pacientes afectados por un carcinoma de páncreas no reseable, del adenovirus ONYX-015 (dl 1520), un adenovirus fragmentado a nivel del gen E1B-55kD que se replica preferentemente en las células tumorales desprovistas de proteína p53 y las mata. La inyección de adenovirus se tolera bien pero no se ha probado ninguna respuesta objetiva. Los Autores subrayan que la replicación viral intratumoral no es lo suficientemente importante y que la eficacia de los adenovirus podría ser optimizada multiplicando las inyecciones de ONYX-015 o bien asociándolas con un tratamiento quimioterapéutico.

15

- Más recientemente, HECHT y al. (Clinical Cancer Research, 2003, 9, 555-561) modificaron dicho protocolo proponiendo reemplazar el dispositivo de CT, demasiado molesto y susceptible de provocar serias complicaciones como infecciones o perforaciones, por la endoscopia de ultrasonidos. Sin embargo, los ensayos en fases I/II llevados a cabo por este equipo no demostraron mejoría alguna de la eficacia del tratamiento con ONYX-015.

20 Además, se observaron casos de perforaciones duodenales debidas a la endoscopia.

25

- Otros adenovirus fueron probados para tratar tumores digestivos. Es así como el equipo de SANGRO y al. (Journal of Clinical Oncology, 2004, 22, 8, 1389-1397) describió la inyección intratumoral de un adenovirus que deriva en la interleuquina 12 (IL-12), denominada Ad.IL-12, en pacientes afectados por cánceres pancreáticos, colorectales o hepáticos. Estos ensayos de fase 1 sólo revelaron una actividad antitumoral moderada. Siempre orientando sus investigaciones hacia la expresión intratumoral de IL-12 por el adenovirus Ad.IL-12 (también denominado AFIL-12), el mismo equipo ha probado más recientemente la inyección intratumoral de células dendríticas transfectadas por el adenovirus AFIL-12 (MAZZOLINI y al., Journal of Clinical Oncology, 2005, 23, 5, 999-1010). Sin embargo, se requieren ensayos clínicos suplementarios para evaluar la eficacia real de dicho tratamiento.

30

- Finalmente, la administración intratumoral de un vector adenoviral codificante para el TNF- α asociado a una radio-quimioterapia con 5-FU fue igualmente probada. Este ensayo mostró una actividad antitumoral en las dosis máximas de vector adenoviral - TNF- α (Senzer N. y al., J Clin Oncol, 2004, 22 (4) : 592-601). No obstante, la inyección de un vector adenoviral produce generalmente reacciones indeseables tales como fiebre, náuseas, una linfopenia, etc...

35 Además de las estrategias que recurren a los adenovirus, terapias que utilizan el criterio de los “genes-suicida” (en inglés: GDEPT para “*gene-derived enzyme prodrug therapy*”), es decir que asocian la administración de una prodroga y de un gen cuyo producto de traducción metaboliza dicha prodroga en derivado (s) activo (s) tóxico (s) para la célula tumoral, se han desarrollado y probado también contra cánceres del tracto gastrointestinal tal como el cáncer de páncreas. El artículo de GÜNZBURG y SALMONS (Acta Biochimica Polonica, 2005, 52, 3, 601-607) trata sobre este enfoque asociado a la terapia celular en el marco del cáncer de páncreas. Los Autores de dicho artículo señalan la necesidad de precisar nuevas estrategias de tratamiento del cáncer más eficaces que los tratamientos existentes hoy en día. Es así como los Autores de dicho artículo propusieron administrar, en cánceres del páncreas no-operables, unas micro-cápsulas de sulfato de celulosa que contienen células HEK 293 recombinantes que derivan en el citocromo P450 2B1, en asociación con la ifosfamida y ello para disminuir las dosis eficaces de ifosfamida, habitualmente muy tóxica, por la media-vida muy corta de la forma plasmática activa. La administración de las micro-cápsulas se efectúa o bien directamente en el tumor, o bien en la circulación vascular que alimenta dicho tumor, y permite concentrar el citocromo P450 a nivel de dicho tumor y por lo tanto enfocar la acción de los metabolitos de la ifosfamida, (LÖHR y al., The Lancet, 2001, 357, 1591-1592). Los ensayos clínicos llevados a cabo hasta ahora en el hombre han mostrado una duplicación de la media de vida (LOHR y al., 2001) y un porcentaje de vida multiplicado por 3 (LÖHR y al., 2001 ; GÜNZBURG y SALMONS, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos no son satisfactorios y no permiten incrementar la vida de los pacientes de manera significativa (promedio de vida de 10 meses y porcentaje de supervivencia después de un año de 35,7 %). Más recientemente, esta técnica se extendió a otros tipos de cánceres pero se limita, por ahora, a los modelos animales. De este modo, SAMEL y al., (Cancer Gene Therapy, 2006, 13, 65-73) aplican la “quimioterapia enfocada” a modelos murinos y muestran que la inyección de dichas microcápsulas asociada a una administración de ifosfamida en ratones que desarrollan un cáncer colorrectal humano asociado a una carcinosis peritoneal puede conducir a una remisión completa del tumor peritoneal.

La terapia celular que utiliza células micro-encapsuladas presenta el gran inconveniente de utilizar una línea celular humana tumorigena (línea HEK 293).

Existe entonces la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas anti-cancerosas, adaptadas a todos los cánceres y principalmente adaptadas al tratamiento de los tumores sólidos, tales como los tumores del tracto gastrointestinal.

5 Los inventores se han propuesto entonces lograr un nuevo tipo de terapia anticancerosa que, asociada a otras terapéuticas, es eficaz y menos tóxica que los tratamientos actualmente propuestos; dicha terapia se adapta particularmente bien a los cánceres del tracto gastrointestinal, tales como los cánceres del páncreas no-operables.

10 La presente invención tiene por objeto la utilización de células aisladas del tejido adiposo blanco extramedular, seleccionadas en el grupo constituido por la fracción estroma-vascular y una subpoblación de dicha fracción estroma-vascular constituida por células adherentes, para la preparación de un medicamento antitumoral que tenga como efecto la reducción o la inhibición del crecimiento tumoral y la inducción de la muerte de las células cancerosas.

El tejido adiposo existe bajo diferentes formas en los mamíferos: el tejido adiposo blanco extramedular que representa el órgano principal de reserva del organismo, el tejido adiposo blanco medular cuya función exacta es desconocida y el tejido adiposo pardo termogénico.

15 Por su gran potencial de expansión que persiste a lo largo de la vida del individuo, el tejido adiposo blanco del adulto constituye una fuente de células abundantes y fáciles de obtener.

El tejido adiposo blanco está constituido por dos fracciones celulares:

- una fracción adipocitaria que representa del 30 % al 60 % de las células adiposas y se caracteriza por la acumulación de triglicéridos (fracción de células flotantes). Dicha fracción está compuesta en su mayoría (99 %) por adipositos diferenciados y por algunos macrófagos contaminantes, ricos en gotas lipídicas,

20 y

- una fracción no-adipocitaria, denominada fracción estroma-vascular (FSV o en inglés SVF para "*stroma-vascular fraction*").

Estas dos fracciones celulares pueden ser separadas según su diferencia de densidad mediante procedimientos como los descritos por BJÖRNTORP y al. (J.Lipid.Res., 1978, 19, 316-24).

25 La fracción estroma-vascular, clásicamente utilizada para estudiar la diferenciación de los preadipocitos en adipositos maduros, es una fracción heterogénea que comprende diferentes subpoblaciones de células (PLANAT-BERNARD V. y al., Circulation, 2004, 109, 656-663 ; ZUK PA. y al., Mol.Biol. Cell, 2002, 13, 4279-95 ; ERICKSON GR. y al., Biochem. Biophys.Res.Comm., 2002, 290, 763-9 ; COUSIN B. y al., Biochem.Biophys. Res. Commun., 2003, 301, 1016-22 ; SAFFORD KM. y al., Biochem.Biophys. Res. Commun., 2002, 294, 371-9 ; Solicitud Internacional WO 02/055678 y Solicitud Americana US 2003/0082152).

30

Más precisamente, los Inventores y otros equipos demostraron anteriormente que resulta posible inducir la diferenciación de las células indiferenciadas de la FSV en diferentes tipos de células diferenciadas. En efecto, las células FSV son capaces de diferenciarse en células que expresan marcadores específicos:

35 - células hematopoyéticas (Solicitud Internacional WO 02/055678, Solicitud Europea EP 1 077 254; Patente US 6,555,374, Solicitud Internacional WO 01/62901),

- células musculares lisas o esqueléticas (Solicitud Internacional WO 02/055678, Solicitud Europea EP 1 077 254 ; Patente US 6,555,374),

- células musculares cardíacas (Solicitud Internacional WO 02/055678),

- células endoteliales, hepáticas, neuronales o astrogiales (Solicitud Internacional WO 01/62901),

40

- células pancreáticas (Solicitud US 2003/0124721) o

- células estromales intraoculares (Solicitud Internacional WO 03/039481).

Además, una subpoblación de células homogéneas de la FSV que deriva en los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC es capaz de diferenciarse en células endoteliales (Solicitud Internacional WO 2005/025584).

45 Según el conjunto de dichas publicaciones, las células diferenciadas obtenidas a partir de las células FSV tienen su aplicación en la reparación de tejido, la reconstitución de líneas celulares y el mejoramiento de las funciones de ciertos tejidos. De este modo, estas células diferenciadas pueden ser utilizadas, según los casos:

- para reconstituir las líneas hematopoyéticas en el marco del tratamiento de las enfermedades en que se observa una depleción medular, por ejemplo para repoblar la médula ósea de pacientes inmunodeprimidos después de un tratamiento anticanceroso como un tratamiento por irradiación;

- para reparar o reconstruir el tejido nervioso, por ejemplo en el marco del tratamiento de patologías cerebrales, como un accidente vascular cerebral, la enfermedad de Alzheimer o el mal de Parkinson.
 - para reconstituir el tejido hepático, por ejemplo en el marco del tratamiento de una degeneración progresiva del hígado;
 - 5 - para reconstituir el tejido muscular cardíaco o esquelético, principalmente en el marco del tratamiento de miopatías, de cardiomiopatías y de las patologías ligadas a una degeneración muscular (infarto del miocardio);
 - para mejorar las funciones del tejido pancreático observado en ciertos desórdenes endocrinos del páncreas;
 - para la reparación o la reconstrucción del tejido intraocular en el marco del tratamiento de lesiones del tejido córneo o del tejido conjuntivo, por ejemplo después de la resección de un tumor; y
 - 10 - para reconstruir total o parcialmente una red vascular funcional, principalmente en el marco del tratamiento de la isquemia.
- Para la reconstitución de las líneas hematopoyéticas y la reparación del tejido nervioso o hepático la Solicitud Internacional WO 01/62901 preconiza igualmente la inyección de las células estromales indiferenciadas y no las células diferenciadas.
- 15 De modo sorprendente, los Inventores han puesto ahora en evidencia la actividad antitumoral de las células del tejido adiposo blanco extramedular, seleccionadas en el grupo constituido por la fracción estroma-vascular y una subpoblación de células aisladas de dicha fracción estroma-vascular constituida por las células que, después de la puesta en cultivo primario de dicha FSV, se adhieren al soporte de cultivo.
- 20 Dicha subpoblación de células adherentes será indiferentemente designada a continuación con los términos "subpoblación de células adherentes", "células adherentes", o "células adherentes de la FSV".
- En lo que sigue, los términos "conjunto de células de la FSV" y "FSV" tienen el mismo significado.
- En el sentido de la presente invención, se entiende por FSV la fracción estroma-vascular que comprende el conjunto de las células que la constituyen. A continuación, y salvo aclaración contraria, la expresión "células de la fracción estroma-vascular" incluye tanto la fracción estroma-vascular completa como la subpoblación de células adherentes.
- 25 La subpoblación de células adherentes representa aproximadamente del 50% al 60 % de la población celular total de la FSV.
- De modo sorprendente, tanto la FSV como dicha subpoblación de células adherentes reduce de modo significativo la progresión tumoral. Dicho efecto se observa no solamente cuando la fracción estroma-vascular o dichas células adherentes son inyectadas localmente a nivel intratumoral, sino también cuando se administran de modo sistémico, por ejemplo por vía parenteral y más precisamente por vía intravenosa.
- 30
- Igualmente de modo sorprendente, la FSV puede ser utilizada para la preparación de dicho medicamento antitumoral con o sin expansión, con o sin tratamiento fisiológico o farmacológico y con o sin modificación por cualquier manipulación del perfil de expresión génica o proteica; las células adherentes pueden ser utilizadas para la preparación de dicho medicamento antitumoral, con o sin tratamiento fisiológico o farmacológico y con o sin modificación por cualquier manipulación del perfil de expresión génica o proteica.
- 35
- Igualmente de modo sorprendente, además del efecto antitumoral directo de las células de la fracción estroma-vascular, dichas células ejercen igualmente un efecto antitumoral de modo indirecto: en efecto, un medio acondicionado por la subpoblación de células adherentes inhibe la viabilidad de las células cancerosas. Este efecto se ve amplificado además cuando dicha subpoblación de células adherentes es puesta previamente en presencia de células cancerosas, preferentemente de las células provenientes del cáncer a tratar.
- 40
- Los inventores demostraron además que, de modo sorprendente, dicho efecto antitumoral está asociado a una inducción *in vitro* e *in vivo* de la muerte celular de las células cancerosas.
- De modo notable, no es necesario inducir la diferenciación de las células FSV o de hacerlas sobreexpresar un factor particular para que cumplan su efecto antitumoral. El efecto se observa cuando se activan dichas células FSV después de su purificación o bien después de un cultivo primario y de la selección de las células adherentes.
- 45
- Según una disposición ventajosa de dicha utilización, dicho medicamento antitumoral está constituido por dichas células aisladas, antes o después de la puesta en cultivo.
- Conforme a la invención, dicha subpoblación de células adherentes se puede obtener mediante el procedimiento que comprende:
- 50 - la obtención de la fracción estroma-vascular a partir del tejido adiposo blanco extramedular;

- la purificación de dicha fracción estroma-vascular;

5 - el aislamiento de las células de dicha subpoblación a partir de dicha fracción purificada mediante la puesta en cultivo primario en un medio líquido conveniente, la selección de las células adherentes en un soporte de cultivo (plástico...) por eliminación de las células no-adherentes, la recuperación de las células después de la confluencia, en un medio conveniente, centrifugado y la recuperación del residuo.

Un ejemplo del procedimiento de obtención de dichas células se describe en el artículo de BJÖRNTORP y al., (nombrado anteriormente). Según una modalidad ventajosa de dicha disposición, dichas células están asociadas a un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Conforme a la invención, dichas células pueden además ser genéticamente modificadas:

10 - Pueden comprender al menos una mutación de un gen autólogo.

- Pueden contener al menos una copia de un gen heterólogo.

Según otro modo de realización ventajoso, dichas células comprenden un gen heterólogo cuyo producto de traducción es una proteína de interés terapéutico, tal como una enzima capaz de metabolizar una prodroga de compuesto (s) activo (s) tóxico (s) para la célula tumoral.

15 Dichas células genéticamente modificadas son preferentemente de origen humano.

Según otra disposición ventajosa de dicha utilización, dicho medicamento antitumoral está constituido por el sobrenadante de cultivo de dicha subpoblación de células adherentes.

Dicho sobrenadante es un sobrenadante de cultivo primario o un sobrenadante de cultivo obtenido después de una o varias pasadas (cultivo secundario o cultivos posteriores).

20 Según una modalidad ventajosa de dicha disposición, dicho sobrenadante se obtiene a partir de un co-cultivo de la subpoblación de células adherentes tal como está definido anteriormente con células cancerosas o con células de una línea celular cancerosa.

25 El tejido adiposo extramedular es de origen animal o de origen humano; preferentemente, tanto las células de fracción estroma-vascular del tejido adiposo extramedular como las células cancerosas son las del paciente a tratar y fueron previamente extraídas del paciente a tratar.

Dicho sobrenadante es un sobrenadante de cultivo primario o un sobrenadante de cultivo obtenido después de una o varias pasadas (cultivo secundario o cultivos posteriores).

Según otro modo de realización ventajoso de dicha utilización, dicho cáncer es un cáncer sólido o un cáncer líquido.

30 Se entiende por cáncer sólido todo cáncer que afecta órganos tales como el hígado, el páncreas, los pulmones, los riñones, etc... en los cuales un tumor se desarrolla localmente y se dispersa por la circulación sanguínea o linfática y forma metástasis. Cáncer sólido se opone a los cánceres líquidos que se refieren a los cánceres de la sangre o del sistema linfático.

Según una disposición preferida de dicho modo de realización, dicho cáncer es un cáncer sólido del tracto gastrointestinal, tal como el cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer colorrectal.

35 Se entiende por cáncer del tracto gastrointestinal los tumores y/o cánceres del esófago, del estómago, del intestino delgado, del intestino grueso o del colon así como los cánceres o tumores de las glándulas anexas del tracto gastrointestinal, tales como el hígado, la vesícula biliar, el canal colédoco y el páncreas.

40 De un modo preferido, el medicamento antitumoral tal como se define anteriormente está particularmente bien adaptado al tratamiento del cáncer del páncreas y de modo aún más preferido al tratamiento del cáncer del páncreas no operable. En tal caso, cuando se utiliza un co-cultivo de la subpoblación de células adherentes y de una línea celular cancerosa, ésta última es ventajosamente la línea de células pancreáticas Capan-1 (ATCC HTB-79).

45 El medicamento antitumoral según la invención se utiliza preferentemente por vía intratumoral, pero puede ser administrado también por otras vías, eventualmente por vías múltiples, principalmente por vías intravenosa, intraperitoneal, tópica, transdérmica, subcutánea, intraarterial, pulmonar, nasofaríngea u oral, en solución acuosa o en polvo o bajo toda otra forma farmacéuticamente aceptable.

Las dosis eficaces se determinarán según la edad, el estado de salud, el peso del paciente y el tipo de cáncer a tratar.

50 Conforme a la invención, la utilización del medicamento antitumoral, tal como se define anteriormente, puede ser combinada con otras terapias, principalmente cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y las terapias diferenciadoras.

- 5 El efecto antitumoral observado, caracterizado por la reducción o la inhibición del crecimiento tumoral y la inducción de la muerte de las células cancerosas (por ejemplo apoptosis) se debe esencialmente a las células de la subpoblación celular tal como se define anteriormente, es decir a las células presentes en la fracción estroma-vascular y seleccionadas sobre la base de su adherencia en soporte sólido (soporte de cultivo) durante un cultivo primario de las células FSV ; no obstante, tanto el conjunto de la fracción estroma-vascular como las células de dicha subpoblación pueden ser realizadas en la invención.
- 10 El medicamento antitumoral tal como se define a continuación (subpoblación de células adherentes FSV, o sobrenadante de cultivo de las células de dicha subpoblación) es particularmente ventajoso por las razones siguientes:
- la toma de muestras de tejido adiposo es fácil de realizar, por ejemplo por liposucción o por biopsia bajo anestesia local;
 - debido a su abundancia, se pueden constituir stocks fácilmente; además, el tejido extraído puede regenerarse rápidamente en el paciente.
 - estas propiedades hacen que las células derivadas del tejido adiposo estén particularmente adaptadas para un trasplante homólogo (por ejemplo trasplante autólogo) o heterólogo;
- 15 - la toma de tejido adiposo y su utilización posterior para fines terapéuticos no tendría que presentar en teoría ningún obstáculo de orden ético ya que la toma de la muestra es poco invasiva y muchas tomas de muestras de tejido adiposo se destruyen actualmente; además, conviene señalar que el periodo de ingreso necesario para retirar dicha muestra es reducido (principalmente no es necesario recurrir a una citaféresis o a una anestesia general).
- 20 - Es posible mantener y multiplicar, incluso inmortalizar estas células *in vitro* en un medio definido; por otra parte, dichas células pueden ser transfectadas y pueden ser utilizadas para derivar en un gen heterólogo, ya que poseen un gran poder secretor. Resulta posible entonces utilizarlas para derivar en una proteína terapéutica, por ejemplo una enzima capaz de convertir una prodroga en droga activa.
- 25 La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de un agente antitumoral tal como se define anteriormente, a saber seleccionado en el grupo constituido por células del tejido adiposo blanco extramedular tal como están definidas anteriormente, el sobrenadante de cultivo de dichas células o el sobrenadante de un co-cultivo de dichas células con células cancerosas o células de una línea celular cancerosa conveniente, como adyuvante en terapia anticancerosa.
- Preferentemente, dicho sobrenadante es un sobrenadante de cultivo primario o un sobrenadante de co-cultivo primario. Puede también tratarse de un sobrenadante de cultivo o de co-cultivo obtenido después de una o varias pasadas.
- 30 La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de un agente antitumoral tal como se define anteriormente, a saber seleccionado en el grupo constituido por células del tejido adiposo blanco extramedular tal como está definido anteriormente, el sobrenadante de cultivo de dichas células o el sobrenadante de un co-cultivo de dichas células con células cancerosas o células de una línea celular cancerosa conveniente, para cribar *in vitro* otros medicamentos antitumorales, principalmente aptos para actuar en sinergia con dichas células o sobrenadantes de dichas células.
- 35 Preferentemente, dicho sobrenadante es un sobrenadante de cultivo primario o un sobrenadante de co-cultivo primario. También puede tratarse de un sobrenadante de cultivo o de co-cultivo obtenido después de una o varias pasadas.
- 40 Además de las disposiciones anteriores, la invención comprende también otras disposiciones que surgirán en la descripción que se encuentra a continuación y que se refiere a ejemplos de realización del procedimiento objeto de la presente invención así como a los dibujos en anexo, en los que se representa:
- Figura 1: Determinación *in vivo* de la progresión tumoral después de la inyección intratumoral de la subpoblación de células de la FSV seleccionadas sobre la base de su adherencia en el soporte de cultivo (□) o de PBS (■). Abscisas: cantidad de días después de la inyección; ordenadas : porcentaje de progresión tumoral. *: p<0,05,***: p<0,001.
 - 45 - Figura 2: Disminución *in vivo* del peso del tumor pancreático después de la inyección intratumoral de la subpoblación de células adherentes. A: determinación del peso del tumor (mg) después de la inyección intratumoral de células de la fracción estroma-vascular (blanco) o de PBS (control) (negro); ***: p<0,001. B: fotografía de tumores extraídos después de la inyección intratumoral de la subpoblación de células adherentes (derecha) o de PBS (izquierda).
 - 50 - Figura 3: Determinación *in vivo* del porcentaje de progresión tumoral después de la inyección intratumoral (I.T.; Δ) o sistémica (I.V.▲) de la subpoblación de células adherentes, o inyección, bien intratumoral o sistémica, de PBS (Testigo: ■). **: p<0,01.
 - Figura 4: Determinación *in vitro* del porcentaje de viabilidad de las células Capan-1 tratadas mediante un medio DMEM:F12OK, mediante sobrenadante de cultivo de dicha subpoblación de células (medio condicionado),

mediante sobrenadante de co-cultivo de dicha subpoblación de células y de células Capan-1 (medio de co-cultivo) o bien mediante medio DMEM: F12 suplementado con 10 µg/ml de TNF-α.***: p<0,001.

- Figura 5: Determinación *in vitro* de la apoptosis de las células Capan-1 inducida por el sobrenadante de cultivo de células de la subpoblación de células adherentes y por el sobrenadante de co-cultivo de las células de la subpoblación de células adherentes con las células Capan-1. A: células Capan-1 puestas en presencia del medio DMEM: F12OK (testigo negativo). B: células Capan-1 tratadas por el sobrenadante de cultivo de células de la subpoblación de células adherentes. C: células tratadas por el sobrenadante de co-cultivo de células de la subpoblación de células adherentes con las células Capan-1, según un ratio Capan-1/células adherentes de 5/1; D: células tratadas por el sobrenadante de co-cultivo de células de la subpoblación de células adherentes con las células Capan-1, según un ratio Capan-1/células adherentes de 1/1.
- Figura 6: Determinación *in vivo* de la apoptosis de las células cancerosas después de la inyección intratumoral de células de la subpoblación de células adherentes. Corte de tumor pancreático testigo (A) o después de la inyección de las células de la subpoblación de células adherentes (B).

Se señala, no obstante, que dichos ejemplos son dados sólo a título de ilustración del objeto de la invención, y no constituyen de ningún modo una limitación.

EJEMPLO 1: Materiales y Métodos

1) Medios utilizados

- El medio DMEM F12-OK comprende para 500 ml de DMEM F 12 (referencia Gibco 31330 038), 5 ml de ASP (solución lista para usar antibióticos+antifúngico: Amfotericina 0,25 µg/ml, estreptomycin 100 µg/ml, penicilina G 100 µg/ml) (referencia SIGMA A7292), 0,5 ml de biotina a 16 mM (0,016 mM final) (referencia SIGMA B4639), 0,5 ml de ácido pantoténico a 18 mM (P5155 Sigma) (0,018 mM final), 0,5 ml de ácido ascórbico a 100 mM (A4034 Sigma) (100µM final).
- El tampón de digestión contiene DMEM F12-OK, 2% de BSA (albúmina sérica bovina) y 2 mg/ml de colagenasa (referencia SIGMA) a razón de 10 ml de medio de digestión para 3 g de tejido. Dicho tampón se filtra mediante filtros 0,2 µm (Acrodisc PF 0.8/0.2 µm, ref PALL6224187, VWR).
- El tampón de lisis comprende 100 ml de solución A (2,08 g de tampón Tris pH 7,65 en 100 ml H₂O estéril) y 900 ml de solución B (8,3 g de NH₄Cl en 1000 ml de H₂O estéril).
- El medio RPMI completo está preparado a partir del medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Gibco/Invitrogen (ref 21875034)) suplementado con 10 % de suero de ternero recién nacido (NCS o "newborn cal serum" (Gibco 18010-159)), con 100 µ/ml de penicilina, 100 µ/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de fungisona (Invitrogen, 15240-096).
- La solución de PBS proviene de Gibco (ref 14200-067)
- La solución de tripsina/EDTA proviene de Gibco (ref 25300-054)

2) Obtención de la fracción estroma-vascular

Digestión

El tejido adiposo proviene de pacientes sometidos a una dermolipectomía o una liposucción:

Para una dermolipectomía:

La cantidad de tejido adiposo necesaria se pesa en una caja estéril, y el conjunto del trabajo se hace bajo campana de cultivo. El tejido es sometido a una disociación mecánica por corte muy fino mediante tijeras, y los fragmentos obtenidos se enjuagan con PBS.

El tejido adiposo extraído se diseca bajo microscopio en cajas estériles que contienen PBS, de forma que se elimine todo rastro de tejido muscular, y luego es digerido a 37°C durante 30 minutos, en un medio de digestión. La digestión se acelera mediante una agitación manual cada 10 minutos.

Para una liposucción:

El protocolo es idéntico salvo en la etapa de disociación mecánica del tejido con tijeras, que resulta innecesario.

Purificación de la fracción estroma-vascular (FSV o SVF)

Después de la eliminación de los fragmentos no digeridos por filtración (filtros de 25 µm (PA 25/21, 25 µm, (PA 25/21, 25 µm, Tejido de Tissus Techniques, Saily-Saillisel), los adipositos maduros se separan del residuo que contiene las células de la SVF por centrifugado (600 g, 10 min). Las células estroma-vasculares aisladas de este modo (residuo) se vuelven a poner en suspensión en 2 ml de medio DMEM:F12 + 10 % de SVN (Suero de ternero recién nacido) y se cuentan (conteo manual en célula hematimétrica o contador de partícula Coulter) y las células se vuelven a poner en suspensión en el mismo medio. Se agrega el mismo volumen de tampón de lisis y la suspensión celular se centrifuga durante 5 minutos a 1600 rpm (500 g). Se elimina el sobrenadante y se retoma el residuo en DMEM:F12 OK (de 500 µl a 1 ml en función del tamaño del residuo).

10 **3) Cultivo celular y obtención de la subpoblación celular**

Después de la obtención de la fracción estroma-vascular (FSV) bruta, según el método descrito anteriormente, las células se siembran en unos recipientes de 25 cm² (Nunc cuello inclinado y tapón filtrador, ref 055422, Dominique Dutscher) a razón de 5x10⁵ a 10⁶ células por caja y puestas en cultivo en el medio DMEM:F12 OK.

15 Se enjuagan las células con PBS al día siguiente de la puesta en cultivo para eliminar todas las células muertas y/o no adherentes, y se cultivan durante 4 a 7 días en un medio DMEM:F12 OK + 10 % NCS.

Después de la confluencia (es decir después de 4 a 7 días de cultivo), se enjuagan las células con PBS de manera que se elimine todo rastro del medio. Se despegan las células con una solución de tripsina/EDTA y se cuentan con un contador de células (Coulter ZI). Se centrifuga la suspensión celular durante 5 min a 1600 rpm (500 g) y se retoma el residuo en un volumen adecuado de PBS, de modo que se obtenga una concentración del orden de 10⁶ células/100 µl.

20 **4) Línea Capan-1 y modelo murino del cáncer de páncreas humano**

Un modelo murino del cáncer del páncreas humano se obtiene tal como se indica a continuación. Dicho modelo presenta un tumor ectópico a nivel subcutáneo.

- Raza Capan-1

25 Las células Capan-1 derivan de metástasis hepáticas de adenocarcinomas pancreáticos humanos (ATCC HTB-79). Las células Capan-1 se cultivan en rutina en el medio de cultivo RPMI completo a 37° C y 5% de CO₂ en recipientes de cultivo (referencia BD Falcon T-175 353028) y se trasplantan cuando alcanzan de 70% a 80 % de confluencia.

- Ratón Swiss nu/nu

30 Los ratones hembras atímicos Swiss Nude (nu/nu) (Charles River) tienen una edad de 6 a 8 semanas en el momento del experimento. Después de la recepción, los ratones Swiss nu/nu se tatúan en la oreja para una identificación posterior, y luego se aclimatan a las condiciones de cría durante 1 semana en un ambiente A2 antes del experimento (servicio de zootecnia del IFR31 en Toulouse), según ciclos diurnos y nocturnos de 12 horas. Los ratones Swiss nu/nu se alojan en una cantidad de 5 por jaula sobre base ventilada.

- Inyección de las células Capan-1

Preparación de las suspensiones celulares inyectables

35 El medio de cultivo de células Capan-1 se aspira y las células se enjuagan con 10 ml de PBS estéril. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se aspira el PBS y las células se disocian con 3 ml de una solución de tripsina/EDTA, durante 5 minutos a 37°C. Se retoman a continuación las células en 7 ml de medio completo y se disocian con una pipeta después de 10 ciclos de aspiración/impulsión y se recuperan en un tubo de 50 ml estéril (Falcon Blue Max 50 ml 352070). Se cuentan las células con un contador de células Z.I. Coulter. Se centrifuga el equivalente de 10⁷ células Capan-1 por ratón a inyectar durante 5 minutos a 1400 rpm (200 g) en condiciones estériles.

40 Se elimina el sobrenadante y se retoma el residuo en 25 ml de medio completo y se disocia con la pipeta después de 10 ciclos de aspiración/impulsión para eliminar todo rastro de tripsina. Después de un centrifugado de 5 minutos a 1400 rpm (200 g), se elimina el sobrenadante, y se somete el residuo a 3 ciclos de lavados en un medio RPMI para eliminar todo rastro de suero. Finalmente se retoman 10⁷ células Capan-1 en 100 µl de PBS estéril para cultivo celular.

Implantación de los tumores Capan-1

50 Los ratones, estrictamente manipulados bajo campana PSM (Puesto de Seguridad Microbiológica) se identifican mediante sus tatuajes, se pesan, se anestesian con isofluorano 0,1 % (Aerrane, Baxter), durante 5 minutos antes de su manipulación. Este protocolo de anestesia general permite un confort en la manipulación de los individuos y garantiza la reproductividad de los resultados, protegiendo del estrés al animal con respecto a los artefactos experimentales consecutivos. Después de constatar el adormecimiento del animal, se inyectan las células Capan-1

(100 µl) en subcutáneo en el lado izquierdo del animal, con una jeringa tuberculina 0,3 ml 29G en 33 mm sin volumen muerto, a la velocidad de 1 ml/h. Se desinfecta el lugar de la inyección, y se colocan los ratones en jaulas limpias. El despertar de los ratones en estas condiciones de experimentación se constata de 5 a 7 minutos después de la anestesia. Los signos vitales de los ratones inyectados se analizan macroscópicamente 24 y 48 horas después de la operación. En estas condiciones, el porcentaje de mortalidad medido es de 0 %.

5) **Inyección de las células de la subpoblación de células adherentes**

La inyección de la subpoblación de células adherentes se realiza de 11 a 14 días después de la implantación de los tumores Capan-1 en ratones atímicos Swiss nu/nu. El volumen medio de los tumores es entonces de $250 \pm 18 \text{ mm}^3$.

Tal como se indica anteriormente, los ratones, estrictamente manipulados bajo campana PSM, se identifican por sus tatuajes, se pesan, y se anestesian con isofluorano 0,1 % durante 5 minutos antes de su manipulación. Después de constatar el adormecimiento del animal, se inyectan las células (5×10^5 en 50 µl de PBS) directamente en el tumor o en la vena caudal.

Para el trasplante intratumoral, se inyectan las células con una jeringa tuberculina 0,3 ml 29 G en 33 mm sin volumen muerto, a la velocidad de 1 ml/h. En este contexto, las células están en un ambiente de células tumorales pancreáticas únicamente; no están en contacto con el tejido pancreático sano. Para la inyección intravenosa, se colocan los ratones en una cámara de inyección calefaccionada a 50° C para facilitar la dilatación de la vena caudal y se inyectan las células con un dispositivo para linfografía sin volumen muerto de calibre 29G en PVC.

En los dos casos, se inyectan 50 µl de PBS estéril en los ratones de control bien a nivel intratumoral o bien por vía sistémica. Se desinfecta el lugar de la inyección y se reubican los ratones en jaulas limpias.

6) **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realiza mediante el programa Graphpad InStat V3.05.

El análisis de variación se realiza por el test unilateral ANOVA completado con un test de comparaciones múltiples Student-Newman-Keuls. Una probabilidad inferior a 0.05 es considerada como estadísticamente significativa.

7) **Detección de la apoptosis mediante la técnica TUNEL**

La apoptosis de las células cancerosas se detecta en cultivos de células Capan-1 o en cortes de tumores pancreáticos provenientes del modelo murino descrito en el Ejemplo 1.4) mediante la técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling). Dicha técnica se basa en la incorporación de nucleótidos marcados a nivel de los extremos 3'OH libres de los fragmentos de ADN generados durante la apoptosis (Gravrieli y al., 1992, The Journal of Cell Biology, Vol. 119, n° 3, páginas 493-501). Se realiza aquí mediante el kit ApopDETEK (EnzoDiagnostic, NY, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

EJEMPLO 2: Efecto antitumoral *in vivo* de las células derivadas del tejido adiposo

El efecto antitumoral de las células de la fracción estroma-vascular del tejido adiposo extramedular se evalúa cuando dichas células se inyectan a nivel intratumoral o por vía sistémica en ratones Swiss nu/nu que desarrollan un tumor pancreático derivado de las células Capan-1.

1) **Inyección intratumoral**

Las condiciones de preparación de los ratones, de la inyección de las células Capan-1 y de la inyección de subpoblación de células adherentes están descritas en el Ejemplo 1.

Después de la inyección de la subpoblación de células adherentes, se mide y registra el peso de los ratones y el crecimiento de los tumores cada 2 días hasta los 14 días siguientes a la inyección de dichas células, midiéndose *in situ* en el animal vivo el crecimiento tumoral. La medición de los largos (L) y anchos (I) de los tumores Capan-1 se realiza con un compás de corredera, según el cálculo siguiente:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = L^2 \text{ (mm)} \times I \text{ (mm)} \times 0,52$$

El porcentaje de progresión tumoral se evalúa a los 3, 6 y 13 días después de la inyección intratumoral de dichas células o de PBS (control) según la fórmula siguiente:

% de progresión tumoral en el tiempo t = [(volumen tumoral en el tiempo t)/(volumen tumoral a t₀)]x 100, t₀ correspondiente a la inyección de la subpoblación de células adherentes o de PBS.

Se suspende el experimento a los 10 o 15 días después de la transferencia de la subpoblación de células adherentes (21 a 39 días después del implante de los tumores) según la progresión exponencial de los tumores testigos, de su ulceración y del riesgo de fallecimiento elevado de los ratones portadores de dichos tumores.

Además de la determinación de la progresión tumoral, mediante la medición del tamaño del tumor, también se determina el peso del tumor. Para ello, se sacrifican los ratones trece días después de la inyección intratumoral de las células y se extraen, se pesan y se fotografían los tumores.

5 Los valores obtenidos, por una parte para la progresión tumoral y por otra para la medición del peso del tumor, son representativos de 3 experimentos independientes, correspondientes a tres preparados diferentes de la subpoblación de células adherentes, y 5 ratones por grupo.

10 Los resultados del test de inhibición de la progresión tumoral se ilustran en la figura 1. Muestran una disminución drástica y significativa del tamaño de los tumores Capan-1 de 46 % \pm 13%, 38%, \pm 8% y 57% \pm 14%, respectivamente 3, 6 y 13 días después de la inyección de las células de la subpoblación. Estos datos muestran un efecto antitumoral que se manifiesta por la disminución drástica de la progresión de los tumores pancreáticos Capan-1 después de la transferencia intratumoral de células. El experimento no pudo continuar por el crecimiento exponencial y la ulceración de los tumores testigos.

15 Los resultados relativos a la medición del peso y del tamaño de los tumores 13 días después de la inyección de la subpoblación de células adherentes se encuentran ilustrados en la figura 2. Muestran una disminución del 50 % \pm 0,1 % del peso de los tumores Capan-1 después de la inyección intratumoral de dichas células. Estos resultados coinciden con los relativos al porcentaje de progresión tumoral, obtenidos a partir de la medición extrínseca del tamaño de los tumores (figura 1) y confirman por lo tanto el papel antitumoral de las diferentes células cuando las mismas son inyectadas a nivel intratumoral.

2) Inyección sistémica

20 En forma paralela a dichos estudios de disminución de la progresión tumoral mediante una inyección intratumoral de la subpoblación de células adherentes, los inventores procedieron a la administración de dichas células por vía sanguínea, a los efectos de determinar si podían migrar hasta el lugar del tumor y ejercer allí su efecto.

25 Las condiciones de preparación de los ratones y de inyección de las células Capan-1, de la subpoblación de células adherentes y del PBS se describen en el Ejemplo 1. Más precisamente, los Inventores compararon el efecto de las células de la subpoblación administradas directamente en los tumores Capan-1 (inyección intratumoral) o en la vena caudal (inyección sistémica). El tamaño de los tumores se mide tal como se indica anteriormente 3 días después de la transferencia de las células de la subpoblación. Los valores obtenidos son representativos de 2 experimentos independientes correspondientes a dos preparados de células diferentes, y 3 o 4 ratones por grupo. Los resultados se encuentran ilustrados en la figura 3. Muestran que la magnitud de la inhibición de la progresión tumoral medida 3 días después de la transferencia de las células de la FSV, cuando las mismas se inyectan en la vena caudal de los ratones portadores de tumores Capan-1, es comparable a la observada cuando dichas células se administran directamente en el tumor (-56 % \pm 22 % vs -65 % \pm 26 %).

Estos resultados resultan a favor de un efecto antitumoral *in vivo* de las células de la subpoblación cuando las mismas se inyectan por vía sistémica.

35 El conjunto de los resultados presentados en el Ejemplo 2, que muestran la inhibición de la progresión tumoral por parte de las células de la subpoblación inyectadas localmente a nivel intratumoral o bien administradas por vías sistémica a nivel de la vena caudal, sugiere un fuerte papel antitumoral de las células de la fracción estroma-vascular del tejido adiposo blanco extramedular.

40 Además, estos resultados muestran la focalización del tumor pancreático por las células de la FSV seleccionadas en base a su adherencia en el soporte de cultivo cuando las mismas se administran a distancia en la circulación sanguínea sistémica.

EJEMPLO 3: Medición de la viabilidad celular

Los Inventores midieron asimismo la viabilidad de las células Capan-1 en presencia de sobrenadante de cultivos de la subpoblación de células adherentes *in-vitro*, para confirmar y validar los resultados obtenidos *in vivo* (Ejemplo 2).

45 Las células Capan-1 se siembran en séxtuples en cajas de cultivo 96 pozos de fondo plano (Nunc 167008), a razón de 25000 células por pozo en un volumen final de 100 μ l, 48 h después, las células se enjuagan y se tratan:

- con 100 μ l de medio RPMI sin suero (testigo negativo, no representado en la figura 4);
- con 100 μ l de medio RPMI completo (testigo positivo, no representado en la figura 4);

50 - con 100 μ l de medio DMEM: F12 suplementado con 10 μ g/ml de TNF α (testigo positivo de inhibición de la viabilidad);

- con 100 μ l de medio DMEM: F12 OK

- con 100 µl de sobrenadante de cultivo de células de la subpoblación de células adherentes; o
- con 100 µl de sobrenadante de co-cultivo de células de la subpoblación de células adherentes y de células Capan-1.

5 El sobrenadante de cultivo de células de la subpoblación de células adherentes se obtiene después de 48 horas de cultivo en el medio DMEM: F12 OK ; el sobrenadante de co-cultivo de células de la subpoblación de células adherentes y de células Capan-1 se obtiene después de 48 horas de un cultivo de células adherentes y de células Capan-1 en el medio DMEM: F12 OK, según una relación inicial células Capan-1/células adherentes de 5/1 o de 1/1 (respectivamente sobrenadante de co-cultivo 1 y sobrenadante de co-cultivo 2).

10 Dos días (48 h) después, la medición de la viabilidad celular se realiza con el kit CellTiter 96 ® AQueous One Solution Cell Prolifération Assay (Promega G3582). Los valores obtenidos son representativos de 3 experimentos independientes que corresponden a tres preparados de células de subpoblación diferentes.

15 Los resultados se ilustran en la figura 4. Muestran que el medio preparado por la subpoblación de células adherentes (sobrenadante de cultivo) es capaz de inhibir de modo significativo la viabilidad de las células Capan-1. Además, el sobrenadante de co-cultivos de la subpoblación de células adherentes con células Capan-1 presenta un efecto inhibitorio en la viabilidad de las células Capan-1 más pronunciado que el sobrenadante preparado por la subpoblación de células adherentes solas, lo que demuestra que dichas células son capaces de reaccionar ante la presencia de células cancerosas pancreáticas.

20 Estos resultados demuestran un efecto antitumoral de un medio preparado por las células de la fracción estroma-vascular del tejido adiposo blanco extramedular, pudiendo dicho efecto ser mayor cuando las células se activan con células cancerosas tales como las células de la línea Capan-1.

EJEMPLO 4: Inducción de la apoptosis

25 Los Inventores investigaron si el efecto antitumoral de las células de la fracción estroma-vascular del tejido adiposo blanco extramedular y de los sobrenadantes de cultivo y de co-cultivo es debido a la inducción de la apoptosis de las células cancerosas.

1) Inducción *in vitro* de la apoptosis de las células Capan-1

Las células Capan-1 se siembran en triplicado y se cultivan en Labteck 4 pozos (Dutscher), a razón de 50 000 células por pozo, en un volumen final de 500 µl, siendo luego enjuagadas y tratadas con:

- 500 µl de medio DMEM: F12OK o de medio RPMI 10 %;
- 30 - 500 µl de sobrenadante de cultivo de células de la subpoblación de células adherentes;
- 500 µl de sobrenadante de co-cultivo 1;
- 500 µl de sobrenadante de co-cultivo 2;

35 El sobrenadante de cultivo de células de la subpoblación de células adherentes se obtiene tal como se indica en el Ejemplo 3.

24 horas después, el apoptosis se evalúa con la técnica TUNEL tal como se indica en el Ejemplo 1.7).

Los resultados se ilustran en la Figura 5.

40 Se observa un marcado nuclear de las células Capan-1 tratadas por el sobrenadante de cultivo de las células de la subpoblación de células adherentes (Figura 5B). Dicho marcado no se observa para las células Capan-1 puestas en presencia del medio DMEM: F12 OK o de RPMI 10 % (Figura 5A). Para las células Capan-1 tratadas por el sobrenadante de co-cultivo 1, el marcado nuclear es más intenso (Figura 5C) y la intensidad aumenta aún más con un tratamiento con el sobrenadante de co-cultivo 2, para el cual se observa además una condensación del citoplasma (Figura 5D). Estos resultados muestran un aumento cuantitativo de la fragmentación del ADN en presencia de sobrenadante de co-cultivo, y por lo tanto un aumento de la apoptosis de las células Capan-1.

45 Estos resultados muestran entonces que el sobrenadante de cultivo de las células de la subpoblación de células adherentes, y el sobrenadante de co-cultivo de las células de la subpoblación de células adherentes son capaces de inducir *in vitro* la apoptosis de las células Capan-1.

2) Inducción *in vivo* de la apoptosis de las células cancerosas pancreáticas

Las condiciones de preparación de los ratones, de la inyección de las células Capan-1 y de la inyección intratumoral de la subpoblación de células adherentes se describen en el Ejemplo 1.

5 Cinco días después de la inyección de las células de la subpoblación de células adherentes, se realizan biopsias de tumor pancreático y se preparan cortes. Para el testigo negativo, se preparan unos cortes de tumores a partir de ratones que no han recibido células de la subpoblación de células adherentes. La apoptosis se detecta en estos dos tipos de preparado mediante la técnica TUNEL tal como se indica en el Ejemplo 1.7).

Los resultados están indicados en la Figura 6.

10 No se detecta ningún marcado en los cortes de tumores provenientes de los ratones testigo (Figura 6A). Sin embargo, se observa un marcado nuclear en numerosas células cancerosas provenientes de ratones que recibieron la inyección de células de la subpoblación de células adherentes (Figura 6B) lo que demuestra el ingreso en apoptosis de dichas células.

Estos resultados indican que las células de la subpoblación de las células adherentes son capaces de inducir *in vivo* la apoptosis de las células cancerosas.

REIVINDICACIONES

1. Células aisladas del tejido adiposo blanco extramedular, seleccionadas en el grupo constituido por la fracción estroma-vascular y una subpoblación de dicha fracción estroma-vascular constituida por células adherentes para utilización como medicamento antitumoral que tiene por efecto la reducción o la inhibición del crecimiento tumoral y la inducción de la muerte de las células cancerosas.
- 5 2. Células aisladas del tejido adiposo blanco extramedular para utilización según la reivindicación 1, caracterizadas porque dicha subpoblación de células adherentes es susceptible de ser obtenida mediante un procedimiento que comprende:
 - la obtención de la fracción estroma-vascular a partir del tejido adiposo blanco extramedular;
 - la purificación de dicha fracción estroma-vascular ;
 - 10 - el aislamiento de dicha subpoblación de células a partir de dicha fracción purificada mediante la puesta en cultivo primario en un medio líquido conveniente, la selección de las células adherentes en un soporte de cultivo, la recuperación de las células después de la confluencia, en un medio conveniente, centrifugado y la recuperación del residuo.
- 15 3. Células aisladas del tejido adiposo blanco extramedular para ser utilizadas según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizadas porque están asociadas a un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Células aisladas del tejido adiposo blanco extramedular para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas porque comprenden un gen heterólogo, cuyo producto de traducción es una proteína de interés terapéutico, tal como una enzima capaz de metabolizar una prodroga en compuesto (s) activo (s) tóxico (s) para la célula tumoral.
- 20 5. Células aisladas del tejido adiposo blanco extramedular para su utilización según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizadas porque dicho medicamento antitumoral está constituido por el sobrenadante de cultivo de dicha subpoblación de células adherentes.
- 25 6. Células aisladas del tejido adiposo blanco extramedular para su utilización según la reivindicación 5, caracterizadas porque dicho sobrenadante se obtiene a partir de un co-cultivo de dicha subpoblación de células con células cancerosas o con células de una línea celular cancerosa.
7. Células aisladas del tejido adiposo blanco extramedular para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizadas porque dicho cáncer es un cáncer sólido o un cáncer líquido.
8. Células aisladas del tejido adiposo blanco extramedular para su utilización según la reivindicación 7, caracterizadas porque dicho cáncer es un cáncer sólido del tracto gastrointestinal.
- 30 9. Células aisladas del tejido adiposo blanco extramedular para su utilización según la reivindicación 7, caracterizadas porque dicho cáncer se selecciona en el grupo constituido por el cáncer de páncreas, el cáncer gástrico y el cáncer colorrectal.
- 35 10. Agente antitumoral tal como está definido en las reivindicaciones 1 a 6, a saber seleccionado en el grupo constituido por células del tejido adiposo blanco extramedular, tales como las definidas en la reivindicación 1, el sobrenadante de cultivo de dichas células o el sobrenadante de un co-cultivo de dichas células con células cancerosas o células de una línea celular cancerosa conveniente, para utilizar como adyuvante en terapia anticancerosa.
- 40 11. Utilización de un agente antitumoral tal como se define en las reivindicaciones 1 a 6, a saber seleccionado en el grupo constituido por células del tejido adiposo blanco extramedular, tales como están definidas en la reivindicación 1, el sobrenadante de cultivo de dichas células o el sobrenadante de un co-cultivo de dichas células con células cancerosas o células de una línea celular cancerosa conveniente, para cribar *in vitro* otros medicamentos antitumorales, principalmente aptos para actuar en sinergia con dichas células o sobrenadante de dichas células.

FIGURA 1

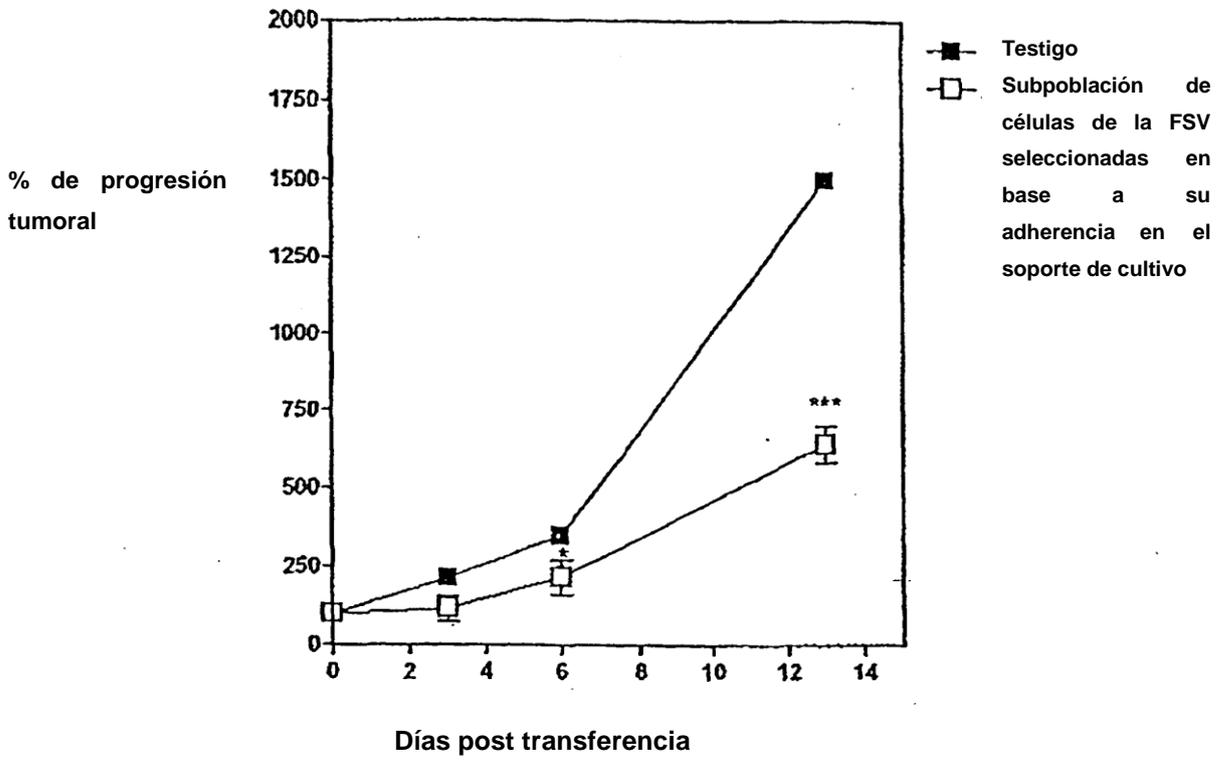
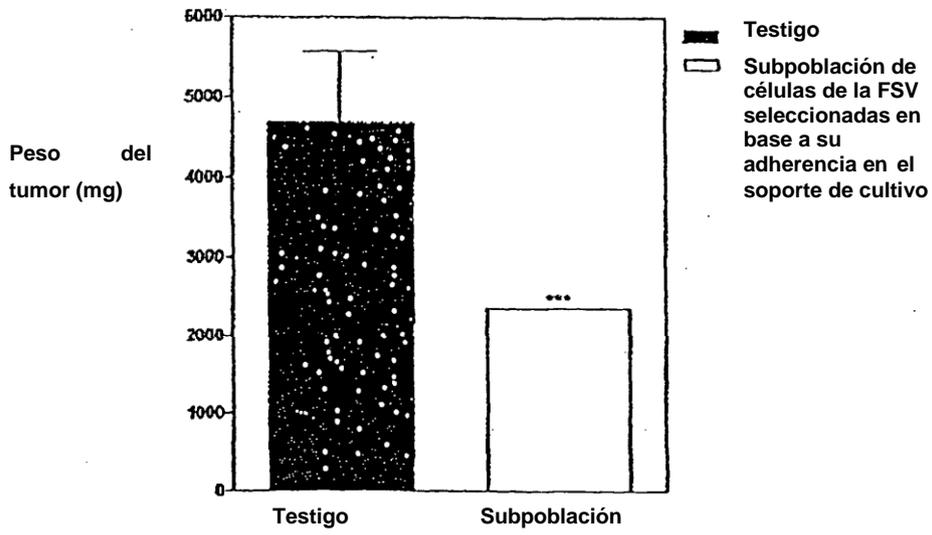


FIGURA 2
Fi

A



B

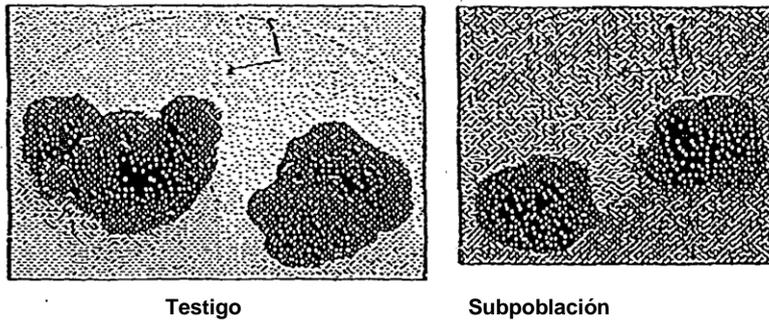


FIGURA 3

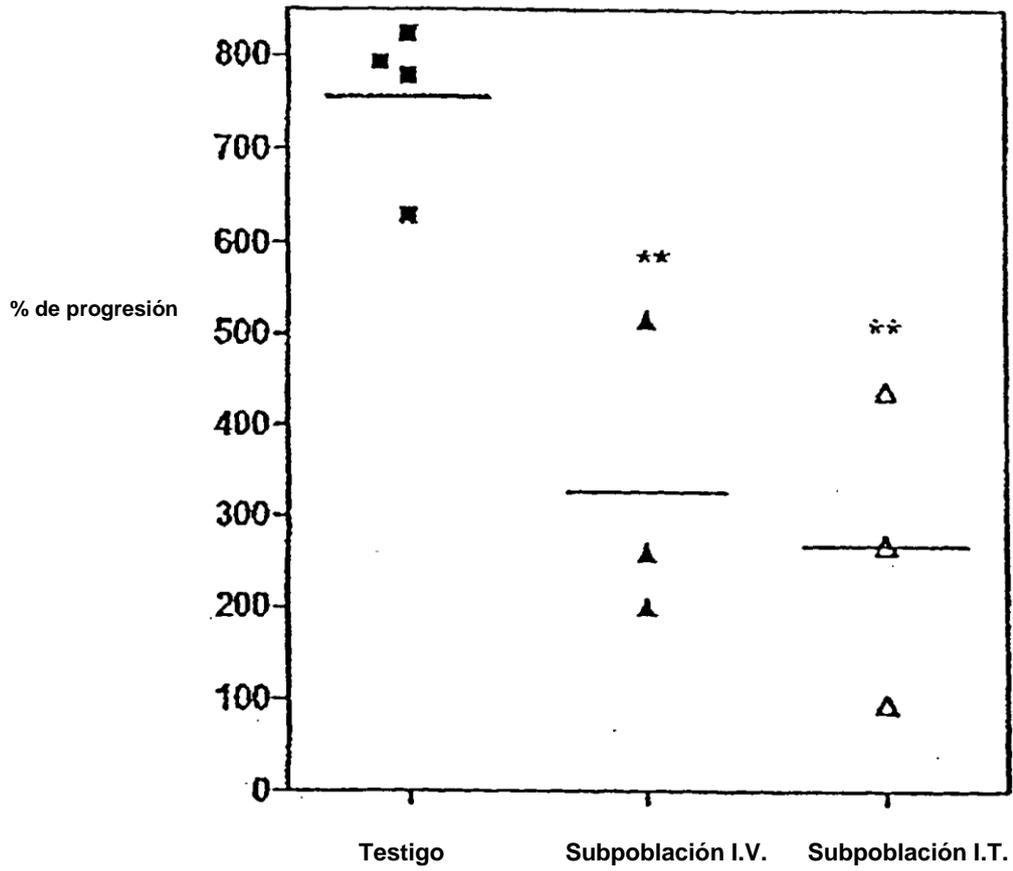


FIGURA 4

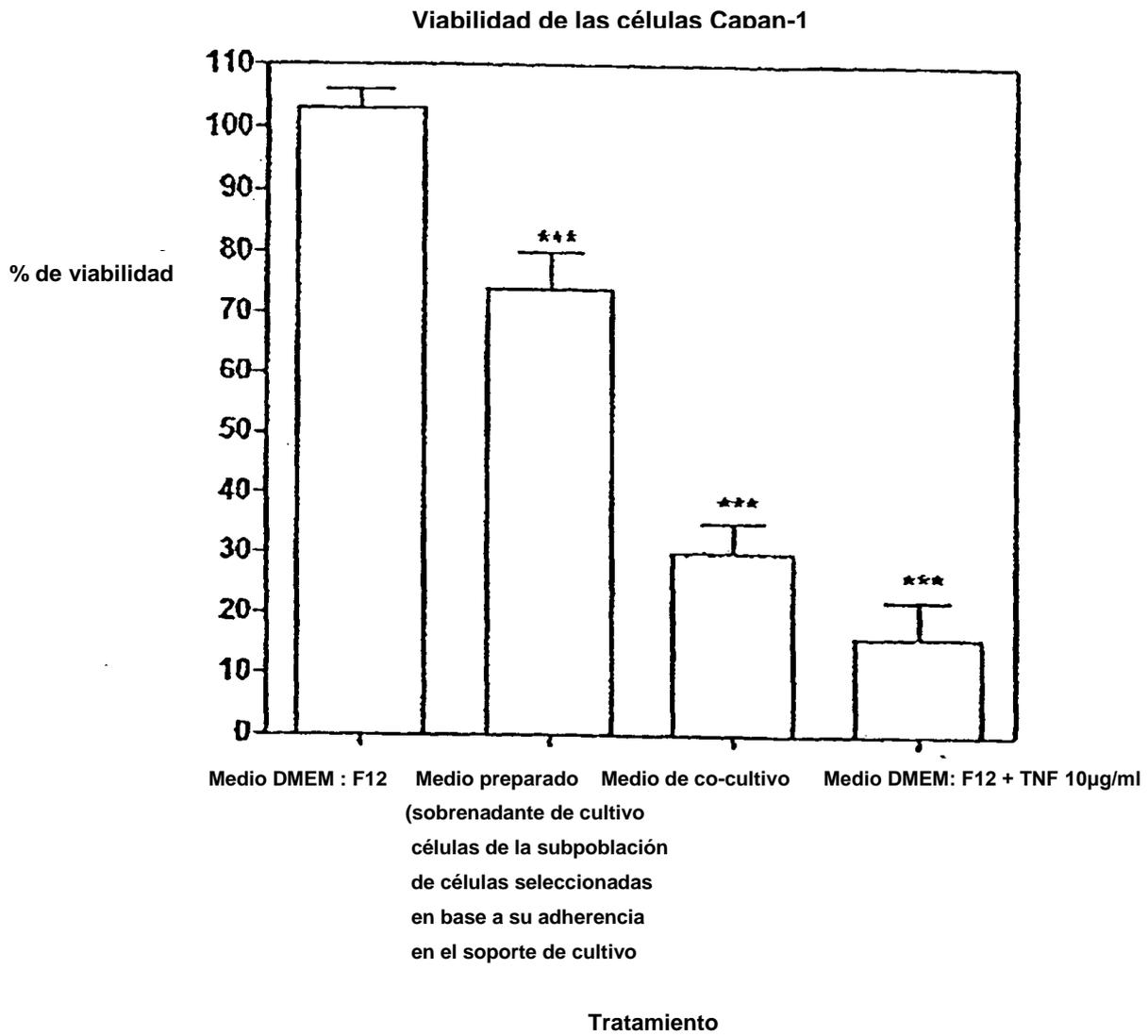


FIGURA 5

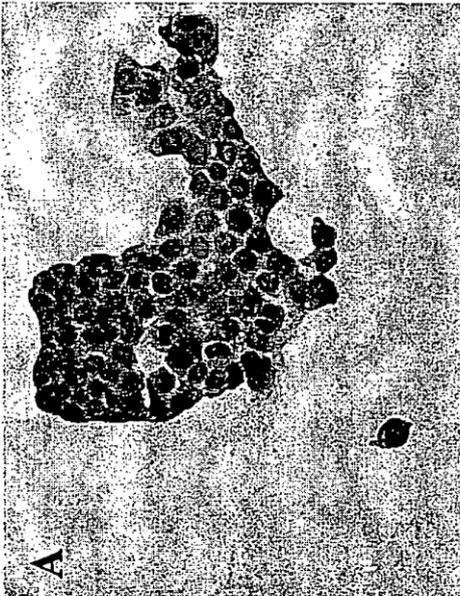
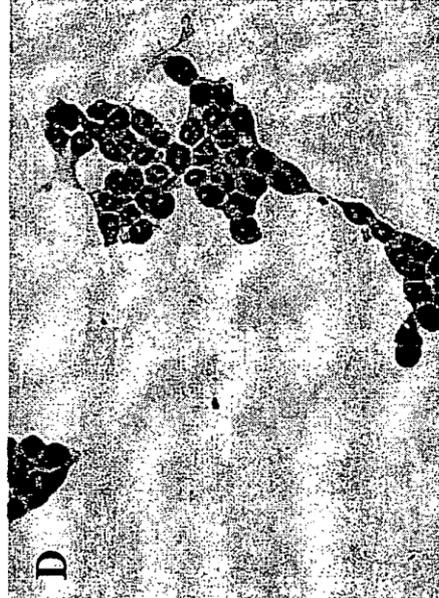


FIGURA 6

