

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 297**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 35/28 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/IB2012/057611**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093878**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12824720 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2793929**

54 Título: **Un medio acondicionado obtenido a partir de células madre mesenquimatosas de placenta y uso del mismo en el tratamiento terapéutico de la preeclampsia**

30 Prioridad:
21.12.2011 IT TO20111183

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2017

73 Titular/es:
CORION BIOTECH S.R.L. (100.0%)
Via G. Quarello 15/a
10135 Torino, IT

72 Inventor/es:
ROLFO, ALESSANDRO y
TODROS, TULLIA

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 606 297 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

Un medio acondicionado obtenido a partir de células madre mesenquimatosas de placenta y uso del mismo en el tratamiento terapéutico de la preeclampsia

5

La preeclampsia (PE) es un síndrome relacionado con el embarazo grave que afecta al 5-10 % de todas las mujeres embarazadas, por lo que representa una de las principales causas de mortalidad y morbilidad materno-fetal en todo el mundo. La preeclampsia es un trastorno multisistémico que se manifiesta por sí mismo durante el tercer trimestre del embarazo con una sintomatología caracterizada por hipertensión materna en mujeres previamente normotensas, proteinuria más alta de 0,3 gramos por día y edema generalizado. Junto con una afección de la salud materna comprometida, el síndrome preeclámpico presenta varios factores de riesgo para el feto, estando por lo general acompañado de defectos de crecimiento fetal intrauterino (restricción del crecimiento fetal intrauterino).

10

15

A pesar de que la preeclampsia ha sido objeto de una intensa investigación por parte de la comunidad científica clínica durante la última década, su etiopatogenia sigue siendo poco clara y el único tratamiento terapéutico eficaz es un parto programado y a menudo prematuro. Incluso cuando el recién nacido sobrevive al parto prematuro, esta intervención presenta varios riesgos como enfermedades pulmonares, retinopatía, parálisis cerebral, retraso mental, enfermedades cardiovasculares y metabólicas que podrían manifestarse también durante la edad adulta. Por otra parte, a pesar de que la preeclampsia desaparece en el parto con la eliminación de la placenta, ello podría determinar complicaciones a largo plazo maternas graves. Entre estas, se informó de un riesgo significativamente más alto de hipertensión crónica, diabetes mellitus, enfermedad renal crónica y enfermedades cardiovasculares.

20

25

Sobre esta base, es evidente que este síndrome relacionado con el embarazo grave tiene importantes implicaciones clínicas y socioeconómicas. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de tratamientos farmacológicos eficaces que puedan actuar sobre el amplio intervalo de factores etiopatogénicos típicos de la preeclampsia, permitiendo de esta manera prolongar el tiempo del parto y evitar lesiones tediosas y graves potencialmente permanentes tanto para la madre como para el recién nacido.

30

A pesar de que la PE se manifiesta repentinamente durante el tercer trimestre del embarazo, es probable que se origine durante el primer trimestre, momento en el que comienza el delicado proceso de diferenciación e invasión del trofoblasto. Los estudios histomorfológicos han resaltado que los embarazos preeclámpicos se caracterizan por un proceso de placentación anómalo con remodelación defectuosa de las arterias espirales maternas debida a la invasión superficial de la decidua por el trofoblasto. Estos defectos conducen a una reducción prolongada de la perfusión útero-placentaria, con el consiguiente daño isquémico y liberación de moléculas tóxicas responsables de la inflamación materna y de la placenta exacerbada y daño endotelial generalizado. El TNF-alfa ("factor de necrosis tumoral alfa") desempeña un papel fundamental en la activación y la propagación de la respuesta inflamatoria. Se ha encontrado expresión en suero y en placenta de TNF-alfa incrementada significativamente en mujeres embarazadas afectadas de preeclampsia en comparación con mujeres con un embarazo fisiológico. Por otra parte, se sabe que el TNF-alfa es corresponsable de la invasividad del trofoblasto reducida típica de este síndrome relacionado con el embarazo.

35

40

45

La placenta es un órgano complejo compuesto de diferentes tejidos, como el mesénquima, que representa el componente celular de la placenta más abundante. Los estudios recientes han demostrado que el mesénquima de la placenta y las membranas amnióticas contienen una población celular única con un fenotipo de células madre mesenquimatosas (Huang YC, Yang ZM, Chen XH, Tan MY, Wang J, Li XQ, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placental decidua basalis and resistance to hypoxia and serum deprivation. *Stem Cell Rev.* 2009;5(3):247-55). Estas células, llamadas células madre mesenquimatosas de la placenta (PDMSC), se caracterizan por potenciales proliferativos, diferenciadores y autorenovadores muy elevados, así como por actividades inmunodepresoras y antiinflamatorias. Por otra parte, las PDMSC desempeñan un papel clave en la regulación de los procesos reparadores y proliferativos de las células vecinas. Ruster B y sus compañeros informaron de que las MSC poseen la capacidad de migrar de forma espontánea hacia los tejidos y órganos dañados con el fin de participar en el proceso reparador (Ruster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrián R, Müller S, Seifried E, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006;108(12):3938-44).

50

55

60

Sobre la base de las propiedades de plasticidad y diferenciación funcionales únicas descritas anteriormente, así como de la alta accesibilidad y uso de la placenta por sí misma, las células madre mesenquimatosas de la placenta se convirtieron en objeto de investigación principalmente en el campo de la medicina regenerativa. Por otra parte, para respaldar adicionalmente el uso clínico de las PDMSC en este campo, las células madre mesenquimatosas son no inmunógenas, dado que no expresan las moléculas de HLA de tipo II ni las moléculas coestimulantes (CD80, CD86, CD40) necesarias para estimular directamente los linfocitos T y son resistentes a la lisis mediada por linfocitos T citotóxicos. Las características inmunológicas distintivas de estas células sugieren que podrían desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia materno-fetal.

65

5 Como se describirá con más detalle en la siguiente sección experimental, los autores de la presente invención observaron que el medio acondicionado (CM) obtenido cultivando las células madre mesenquimatosas de la placenta en un medio de cultivo líquido ejerce un efecto antiinflamatorio notable en explantes vellosos de la placenta obtenidos a partir de embarazos complicados por preeclampsia. En particular, los autores de la invención informaron de que el tratamiento de los explantes vellosos patológicos usando medio de cultivo acondicionado por PDMSC obtenidas a partir de la placenta de mujeres no afectadas de preeclampsia, induce una reducción de la expresión génica significativa y extraordinaria de la citocina proinflamatoria TNF-alfa.

10 Por lo tanto, esto permite usar eficazmente el medio acondicionado obtenido a partir de células madre mesenquimatosas de la placenta cultivadas en un medio líquido para el tratamiento terapéutico de la preeclampsia.

15 Con el fin de identificar las proteínas secretadas por las células PDMSC que contribuyen lo más probablemente en conjunto a los efectos beneficiosos de CM que se describieron anteriormente, los autores de la invención sometieron el CM mencionado anteriormente a análisis proteómico usando una matriz comercial que contenía anticuerpos que podían reconocer específica y simultáneamente diversas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Los datos obtenidos a partir de este análisis proteómico revelaron la presencia de varios factores entre los que son prominentes interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) y proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1).

20 Por lo tanto, la invención se refiere a un medio acondicionado obtenible cultivando una célula madre mesenquimatosas de la placenta recogida después del parto de la placenta de una mujer embarazada no afectada de preeclampsia, en un medio de cultivo líquido, conteniendo el medio acondicionado al menos factores IL-6, IL-10 y MCP-1. Este medio acondicionado es particularmente útil para el tratamiento terapéutico de la preeclampsia. La invención se refiere también a un método de producción del medio acondicionado de la invención, el uso del medio acondicionado de la invención para preparar un medicamento para su uso en el tratamiento terapéutico de la preeclampsia y métodos de tratamiento terapéutico antiinflamatorios en pacientes afectadas de preeclampsia.

30 En la presente descripción, el término "célula madre mesenquimatosas de la placenta" indica una célula madre mesenquimatosas aislada de la placenta de una mujer embarazada no afectada de preeclampsia. La eficacia terapéutica de estas células es realmente sorprendente, ya que el medio acondicionado obtenido cultivando células madre mesenquimatosas aisladas a partir de placentas preeclámpticas no ejerce ningún efecto antiinflamatorio en explantes de la placenta patológicos, al contrario de lo que se ha descrito para células madre mesenquimatosas derivadas de placentas fisiológicas.

40 Las células madre mesenquimatosas de la placenta pueden pertenecer a diferentes poblaciones celulares, dependiendo del tejido de la placenta de origen. En realidad, la placenta humana tiene una estructura única que incluye tanto tejido fetal, tal como corion (corion liso y corion frondoso) y amnios, así como tejidos maternos, tales como decidua.

45 En un modo de realización preferente, el medio acondicionado de la invención se obtiene cultivando células madre mesenquimatosas de la placenta de origen coriónico. Preferentemente, las células madre mesenquimatosas coriónicas presentan los antígenos de superficie mostrados en la siguiente tabla, según se detecta por análisis citofluorométrico.

Marcador	Análisis citofluorométrico
HLA I	+
CD105 (endoglina)	+
CD166 (ALCAM)	+
CD90 (Thy-1)	+
CD73 (5'-nucleotidasa)	+
CD34	-
HLA-DR	-
CD133 (prominina-1)	-
CD20	-
CD326 (EpCAM)	-
CD31 (PECAM-1)	-

CD45 (PTPRC) -

CD14 -

De forma alternativa, para preparar el medio acondicionado de la invención se utilizarán células madre mesenquimatosas derivadas del amnios, que presentan los antígenos de superficie descritos en la tabla comunicada anteriormente.

5 El medio acondicionado de la invención incluye al menos los factores de IL-6, IL-10 y MCP-1, que son citocinas secretadas por células conocidas por sí mismas y que pueden ejercer un efecto antiinflamatorio significativo.

10 En particular, el mecanismo antiinflamatorio de IL-6 implica tanto la inhibición de la producción de TNF-alfa como, al mismo tiempo, la inducción de la secreción de interleucina-10, un factor que puede inhibir la síntesis de otras citocinas inflamatorias. Por el contrario, el efecto antiinflamatorio de MCP-1 está mediado por una potente acción inhibitoria dirigida a las poblaciones celulares de linfocitos.

15 Además de las citocinas mencionadas anteriormente, el análisis del medio de cultivo acondicionado por PDMSC, realizado mediante el uso del RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 kit, reveló la presencia de otros moduladores funcionales secretados por las células madre mesenquimatosas de la placenta, identificando así un perfil de expresión de proteínas distinto.

20 Por lo tanto, en aún otro modo de realización, el medio acondicionado de la invención comprende un factor secretado por células adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en: ENA-78, GCSF, GRO, GRO-alfa, IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, MCP-2, MCSF, MDC, ANGIOGENINA, ONCOSTATINA m, VEGF, BDNF, BLC, CKb 8-1, EOTAXINA 2, EOTAXINA 3, LIGANDO FLT-3, FRACTALCINA, GCP-2, GDNF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IP-10, LIF, LIGHT, MCP-4, MIF, MIP-3alfa, NAP-2, NT-3, OSTEOPONTINA, OSTOPROTEGERINA, TGF-beta 2, TIMP-1, TIMP-2, RANTES, IGFBP-3, IL1b, IL-3, MIP-1b, PIGF, IL-1a, 25 1309, FGF9, TARC, PDGF-bb, LEPTINA, TNF-alfa y cualquier combinación de los mismos. En un modo de realización preferente, el factor secretado por células adicional que está presente en el medio acondicionado de la invención es interleucina 8 (IL-8), que se expresa y se secreta por las células en una cantidad alta en el medio acondicionado.

30 En un modo de realización preferente, el medio acondicionado se utiliza para el tratamiento terapéutico de la preeclampsia.

35 Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención es el medio acondicionado de la presente invención para su uso en el tratamiento terapéutico de la preeclampsia.

40 Dado que la PDMSC posee la característica única de ser no inmunógena, el medio acondicionado de la invención comprende, de acuerdo con un modo de realización, una fracción celular que consiste en las células madre mesenquimatosas de la placenta para las que se obtuvo. De forma alternativa, el medio acondicionado está libre de componentes celulares.

45 Como alternativa al medio acondicionado, las células madre mesenquimatosas de la placenta derivadas de mujeres embarazadas no afectadas de preeclampsia, preferentemente de origen coriónica o como alternativa de origen amniótico, se pueden usar para el tratamiento terapéutico de la preeclampsia. Como se menciona previamente, el término "de la placenta", en el contexto de la presente invención, indica la derivación de embarazos fisiológicos no afectados de preeclampsia.

50 Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención es una célula madre mesenquimatosas de la placenta recogida después del parto de la placenta de una mujer embarazada no afectada de preeclampsia, preferentemente de origen coriónico o como alternativa de origen amniótico, para su uso en el tratamiento terapéutico de la preeclampsia.

El alcance de la presente invención también incluye un método de preparación del medio acondicionado descrito anteriormente, que comprende las etapas de:

55 (i) cultivar células madre mesenquimatosas de la placenta recogidas después del parto a partir de la placenta de una mujer embarazada no afectada de preeclampsia en un medio de cultivo basal líquido libre de suero durante al menos 3 horas;

60 (ii) separar la fracción celular del medio de cultivo líquido, obteniendo de este modo un medio acondicionado que comprende una combinación de factores secretados por dichas células madre mesenquimatosas de la placenta, comprendiendo dicho medio acondicionado al menos interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1).

Preferentemente, el medio acondicionado obtenible por el método de la invención comprende un factor secretado por células adicional que se selecciona del grupo que consiste en ENA-78, GCSF, GRO, GRO-alfa, IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, MCP-2, MCSF, MDC, ANGIOGENINA, ONCOSTATINA m, VEGF, BDNF, BLC, CKb 8-1, EOTAXINA 2, EOTAXINA 3, LIGANDO FLT-3, FRACTALCINA, GCP-2, GDNF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IP-10, LIF, LIGHT, MCP-4, MIF, MIP-3alfa, NAP-2, NT-3, OSTEOPONTINA, OSTEOPROTEGERINA, TGF-beta 2, TIMP-1, TIMP-2, RANTES, IGFBP-3, IL1b, IL-3, MIP-1b, PIGF, IL-1a, I309, FGF9, TARC, PDGF-bb, LEPTINA, TNF-alfa y cualquier combinación de los mismos.

En un modo de realización preferente, el factor secretado por células adicional que está presente en el medio acondicionado de la invención es la interleucina-8 (IL-8), que se expresa y se secreta en cantidades altas por las células en el medio acondicionado.

En un modo de realización adicional, el método de la invención también comprende la etapa (iv) de aislar del medio acondicionado obtenido en la etapa (iii) uno o más factores secretados a partir de las células madre mesenquimatosas de la placenta.

En el contexto de la presente descripción, el término "basal" indica un medio de cultivo que contiene sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas habitualmente requeridas para sustentar el crecimiento de células de mamífero que no tienen requisitos nutricionales particulares. A modo de ejemplo y sin limitación, se mencionan los siguientes medios de cultivo líquidos, que se diferencian por el contenido en sales y aminoácidos: *medio de Eagle basal* (BME), *medio esencial mínimo* (MEM), *medio de Eagle modificado de Dulbecco* (DMEM), *mezcla de nutrientes F-10* (F-10 de HAM) y *mezcla de nutrientes F-12* (F-12 de HAM). Los medios de cultivo mencionados anteriormente se citan como ejemplos ilustrativos de medio de cultivo adecuado para su uso en la producción del medio acondicionado de la invención.

La selección del medio de cultivo más apropiado está dentro del alcance de los expertos en la técnica.

De acuerdo con el método de la invención, el medio de cultivo no está complementado con suero, a fin de evitar que los factores de crecimiento contenidos en el suero interfieran y alteren los efectos producidos por factores específicos secretados por PDMSC.

Antes de recoger el medio acondicionado, las células madre mesenquimatosas de la placenta se cultivan durante un tiempo suficiente para permitir su adhesión al sustrato de cultivo, su multiplicación y la secreción de los componentes que caracterizan al medio mencionado anteriormente y hacerlo eficaz de manera beneficiosa para el tratamiento terapéutico de la preeclampsia. Por lo tanto, las células madre mesenquimatosas de la placenta se cultivan durante al menos 3 horas, preferentemente durante al menos 12, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas o incluso más.

Con el fin de separar la fracción celular del medio acondicionado por PDMSC, se pueden usar diferentes métodos conocidos por sí mismos. Por ejemplo, el medio acondicionado de la invención se puede procesar por filtración usando filtros de porosidad adecuada que permitan retener en suspensión los elementos celulares y sus residuos. De forma alternativa, la separación del medio acondicionado de PDMSC puede lograrse por centrifugación seguida de sedimentación celular. Por lo tanto, en un modo de realización preferente, la etapa de separación del medio acondicionado del componente celular se realiza por filtración o por centrifugación o por una combinación de ambas. La selección del método de separación está dentro del conocimiento y habilidades de los expertos en la materia. Incluso la purificación de uno o más de los factores secretados por células contenidos en el medio acondicionado se lleva a cabo por métodos conocidos por sí mismos, cuya selección y uso correcto están dentro del alcance de los expertos en la técnica.

Con el fin de ejercer una actividad terapéutica eficaz, el medio acondicionado objeto de la invención o la célula madre de la invención son para administrarse a mujeres embarazadas afectadas por este síndrome. Por lo tanto, un objeto adicional de la invención es el uso de un medio acondicionado según se define anteriormente o de una célula madre mesenquimatosas de la placenta recogida después del parto de mujeres embarazadas no afectadas de preeclampsia, para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento terapéutico de la preeclampsia.

Preferentemente, el medicamento está en una forma farmacéutica adecuada para la administración sistémica, más preferentemente por inyección, con el fin de asegurar su difusión en la circulación. Claramente, el uso de sistemas de inyección de cualquier tipo, cuya selección está dentro del conocimiento de la persona experta en la técnica, entra dentro del alcance de la presente invención.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos, no limitativos del alcance de la invención según se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: aislamiento de células madre mesenquimatosas derivadas de placenta (PDMSC)

Las células madre mesenquimatosas derivadas de la placenta (PDMSC) se aislaron de placentas obtenidas a partir de mujeres embarazadas sanas y normotensas con embarazo fisiológico. La recogida de tejidos de la placenta y muestreo se realizaron después del parto y después de obtener el consentimiento informado de acuerdo con las directrices del comité de ética de OIRM Sant'Anna-Ospedale Mauriziano de Turín. Se excluyeron los embarazos afectados de malformaciones congénitas, anomalías cromosómicas (en estructura o número), enfermedades infecciosas, diabetes, síndromes cardiovasculares y metabólicos.

Se separaron mecánicamente de la placenta las membranas de la placenta (amnios y corion liso).

Se extrajeron biopsias de tejido de espesor completo de la placa basal de la placenta (porción de la placenta formada por vellosidades coriónicas y adherente a la pared uterina) después de la eliminación mecánica de la decidua basal (tejido compuesto de células del endometrio materno modificadas por la interacción con el sincitiotrofoblasto).

Después, se lavaron varias veces las biopsias de tejido de la placenta a temperatura ambiente usando HBSS (solución salina tamponada de Hank, en solución acuosa) estéril (Gibco, Invitrogen por Life Technologies), con el fin de eliminar completamente los residuos en la sangre.

A continuación, las biopsias se homogeneizaron mecánicamente y procesaron por digestión enzimática usando 100 U/ml de colagenasa I, (Gibco, Invitrogen por Life Technologies), 5 µg/ml de desoxirribonucleasa I (DNAsa 1, Invitrogen por Life Technologies) en DMEM LG (medio esencial mínimo modificado de Dulbecco con glucosa baja sin L-glutamina y sin suero fetal bovino, FBS), a 37 °C durante 3 horas en un baño de agua termostatzado con agitación.

La suspensión celular resultante se centrifugó después durante 5 segundos, 540 g a 4 °C con el fin de eliminar los residuos tisulares no digeridos. Se recogió el sobrenadante y se filtró a través de filtros rotativos de células con poros de 70 micrómetros de diámetro. Después de la filtración, la solución se centrifugó durante 5 minutos a 540 g, 4 °C con el fin de sedimentar las células. El sobrenadante se desechó después y las células se resuspendieron en HBSS estéril (30 ml por cada 30 gramos de tejido original).

Un volumen de Ficoll-Paque Premium 1,073 (GE Healthcare Europe) se distribuyó en capas por debajo de la solución obtenida como se describe anteriormente, en la proporción de 1:3 con respecto al volumen de partida. La preparación se centrifugó durante 20 minutos a 540 g 20 °C y el anillo de células mononucleares, posicionado en la fase media del gradiente, se recogió, se resuspendió en HBSS (50 ml por cada 30 gramos de tejido original) y se centrifugó 10 minutos a 540 g, 20 °C con el fin de eliminar los residuos de Ficoll.

Después de la centrifugación, el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en DMEM LG complementado con FBS al 10 % (Gibco, Invitrogen por Life Technologies) y gentamicina al 0,1%. Después las células se sembraron en matraces de cultivo celular y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂.

Las células se mantuvieron en cultivo a 37 °C, 5% de CO₂. Al 90 % de confluencia, las células se dividieron por tratamiento con tripsina TrypLE Express (tripsina de origen vegetal sin derivados animales, certificada según las NCF, Invitrogen Life Technologies) con el fin de promover la expansión de las células.

Con el fin de aislar las células madre mesenquimatosas del amnios, las membranas se lavaron repetidamente a temperatura ambiente con HBSS estéril (solución salina tamponada de Hank, en solución acuosa) y el amnios se separó mecánicamente del corion. A continuación el amnios se procesó por digestión enzimática, se separó y se cultivó como se describe anteriormente para las células madre mesenquimatosas derivadas de la placa basal de la placenta (porción coriónica).

Ejemplo 2: caracterización de las PDMSC

Las células madre mesenquimatosas aisladas de placentas fisiológicas a término (placa basal-porción coriónica-) como se describe en el ejemplo 1, se caracterizaron analizando los marcadores antigénicos de superficie principales típicos de este tipo de células por ensayo citofluorimétrico.

La presencia o ausencia de estos antígenos se evaluó usando anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (Myltenyi, Bolonia, Italia). Por evaluación de la fluorescencia, se demostró que todas las líneas celulares de PDMSC fueron positivas para la expresión de los marcadores de superficie CD105, CD166, CD90 y CD73 y negativas para la expresión de HLAII, CD34, CD133, CD20, CD326, CD31, CD45 y CD14, mostrando por lo tanto un fenotipo mesenquimatoso apropiado y excluyendo cualquier contaminación de las células epiteliales/trofoblásticas y progenitores hematopoyéticos. Además, el análisis del fenotipo celular también se llevó a cabo mediante la realización de experimentos de RT-PCR, que mostraron que todas las PDMSC también expresan los genes Oct4 (factor de transcripción de unión a octámeros 4) y NANOG (proteína homeobox NANOG), típicos de células madre embrionarias.

Con el fin de evaluar la pluripotencialidad de las PDMSC, en el tercer paso del cultivo se examinaron las células por su potencial de diferenciación en tres linajes diferentes: osteoblastos, adipocitos y condroblastos. La diferenciación de las PDMSC se obtuvo usando medios de inducción específica. Para la diferenciación osteogénica, los cultivos celulares se incubaron en α -MEM complementado con FCS al 20 %, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM, β -fosfato-glicerol 20 mM, dexametasona 100 nM y ascorbato-2-fosfato 250 μ M. Para la diferenciación adipogénica, los cultivos celulares se incubaron con α -MEM complementado con FCS al 20 %, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, L-glutamina 12 mM, 5 μ g/ml de insulina, indometacina 50 μ M, dexametasona 1×10^{-6} M y 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 μ M. Para la diferenciación condrogénica, los cultivos se incubaron en medio basal condrocítico complementado con 1 ml de R3-IGF-1, 2,5 ml de bFGF, 0,5 ml de transferrina, insulina bovina 1 M, 25 ml de FBS y 0,5 ml de gentamicina/anfotericina-B. El medio se cambió dos veces a la semana durante tres semanas. La diferenciación celular se evaluó usando coloraciones apropiadas. La diferenciación de osteoblastos se evaluó por tinción con rojo de alizarina 5. La alizarina determina la formación de placas de calcio insolubles e intensamente coloreadas, permitiendo así resaltar la matriz ósea. Se evaluó la diferenciación condrogénica por tinción con azul de alcán que forma puentes salinos entre polianiones mucopolisacáridicos ácidos, dejando que los glucosaminoglucanos se colorean de azul. La diferenciación adipogénica se detectó por tinción con rojo de aceite, que resalta los lípidos solubilizados por el disolvente presente en la solución de colorante y los depósitos de grasa de color rojo.

20 Ejemplo 3: producción del medio acondicionado

Con el fin de obtener el medio acondicionado de la invención, se sembraron PDMSC entre los pasos 3 a 5, tiempo en el que alcanzaron el grado apropiado de pureza, como se demuestra por la ausencia de contaminantes trofoblásticos y/o hematopoyéticos derivados del tejido de la placenta original. Más específicamente, las células se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/ml en DMEM LG sin suero fetal bovino (FBS) a una temperatura de 37 °C y 5 % de CO₂. Las PDMSC se cultivaron durante al menos 3 horas a una semana o más. Los medios acondicionados se recogieron después en los puntos de tiempo establecidos, se centrifugaron y/o se filtraron para eliminar los restos celulares contaminantes. Cuando sea necesario, los medios acondicionados obtenidos justo como se describe se pueden conservar mediante su congelación a -80 °C.

Ejemplo 4: análisis de medio acondicionado por matriz de citocinas

Se usó la RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 comercialmente disponible, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el fin de investigar las citocinas secretadas por células presentes en el medio acondicionado por PDMSC de la invención. Este kit de matriz de citocinas específico permite detectar al mismo tiempo 80 citocinas diferentes presentes en la misma muestra. Específicamente, el procedimiento se basa en anticuerpos observados sobre una membrana y que pueden reconocer y capturar citocinas cuando están presentes en la muestra analizada. En el contexto de este experimento, las señales generadas en la membrana de matriz en los sitios de formación de complejo inmune se cuantificaron por análisis densitométrico utilizando el programa informático ImageQuant. Los niveles de expresión de las citocinas así identificadas no se determinaron como valores absolutos, sino que se normalizaron como porcentajes en comparación con un grupo de controles estándar incluidos en el kit, asignando a los controles positivos el valor 100 % y a los controles negativos un valor del 0 %. Los resultados del experimento descrito anteriormente se muestran en la siguiente tabla:

Proteína	% con respecto a los estándares
ENA-78	17,4 %
GCSF	3,8 %
GRO	74,4 %
GRO-alfa	13 %
IL-6	119,4 %
IL-7	19,4 %
IL-8	97,5 %
MCP-1	53,2 %
MCP-2	1,0 %
MCSF	4,4 %
MDC	5,0 %
ANGIOGENINA	11,5 %

ONCOSTATINA M	7,6 %
VEGF	13,3 %
BDNF	2,3 %
BLC	3,3 %
CKb 8-1	6,0 %
EOTAXINA 2	4,2 %
EOTAXINA 3	2,1 %
LIGANDO FLT-3	1,4%
FRACTALCINA	6,1%
GCP-2	6,2%
GDNF	5,1 %
HGF	8,6%
IGFBP-1	4,0 %
IGFBP-2	10,3 %
IGFBP-4	3,1 %
IP-10	1,7 %
LIF	1,0 %
LIGHT	2,0 %
MCP-4	20,8 %
MIF	4,6 %
MIP-3alfa	3,3 %
NAP-2	8,6 %
NT-3	11,4%
OSTEOPONTINA	25,3 %
OSTEOPROTEGERINA	12,0 %
TGF-beta 2	1,68 %
TIMP-1	23,4 %
TIMP-2	48,4 %

Además, el análisis de matriz de citocinas no detectó en el medio acondicionado de la invención las siguientes proteínas, ya que estaban ausentes o presentes en concentraciones por debajo del límite de detección del sistema de matriz: GM-CSF, I-309, IL-1 alfa, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 p40p70, IL-13, IL-15, IFN-gamma, MCP-3, MIG, MIP-1, RANTES, SCF, SDF-1, TARC, TGF-beta 1, TNF-alfa, TNF-beta, EGF, IGF-I, TROMBOPOYETINA, PDGF-bb, LEPTINA, EOTAXINA, FGF 4, FGF 6, FGF 7, FGF 9, IGFBP-3, IGFBP-4, IL-16, NT-4, PARC, PIGF, TGF-beta 3.

Ejemplo 5: evaluación de la eficacia terapéutica del medio acondicionado obtenido a partir de cultivos de PDMSC

Con el fin de evaluar la eficacia terapéutica del medio acondicionado de la invención, se llevaron a cabo una serie de estudios usando un modelo *in vitro* representado por explantes vellosos de la placenta derivados de embarazos afectados de preeclampsia y restricción del crecimiento fetal. En particular, se verificó si el medio acondicionado de la invención podía reducir los niveles de expresión de TNF-alfa en los explantes vellosos de la placenta mencionados anteriormente. La reducción de TNF-alfa se tomó como signo de una actividad antiinflamatoria significativa. Como se describe anteriormente, varias evidencias clínicas y experimentales demostraron que esta citocina proinflamatoria potente se sobreexpresa tanto en la placenta como en el suero de mujeres embarazadas afectadas de preeclampsia.

Los cultivos de 24 explantes vellosos preeclámpticos de la placenta se trataron durante 48 horas con el medio acondicionado obtenido cultivando durante 48 horas PDMSC aisladas de embarazos fisiológicos, como se

describe previamente en el ejemplo 3.

5 Se realizaron la recogida de placentas y muestreo de tejidos después del parto y después de obtener el consentimiento informado de acuerdo con las directrices del comité de ética de O.I.R.M Sant'Anna y Hospital Mauriziano (Turín, Italia). El diagnóstico de preeclampsia se hizo de acuerdo con los siguientes criterios: presencia de hipertensión inducida por el embarazo (sistólica ≥ 140 mmHg o diastólica ≥ 90 mmHg) y proteinuria (≥ 300 mg/24 h) después de las 20 semanas de gestación en mujeres previamente normotensas. En total, veinticuatro explantes, formados por una porción de árbol veloso caracterizada por morfología y estructura preservada y de igual peso, se extrajeron de la placa basal de la placenta y se cultivaron durante 10 horas en 500 μ l de medio HAM F12 sin FBS a 37 °C y 5 % de CO₂ con el fin de equilibrar sus condiciones después de la tensión inducida por el parto. Después de 12 horas, el medio de cultivo se reemplazó con 500 μ l de medio acondicionado (en 12 explantes) o con 500 μ l de medio DMEM LG sin suero (en 12 explantes de control). Los cultivos de explantes se incubaron en las mismas condiciones experimentales durante otras 48 horas. A continuación, los explantes tratados (12) y de control (12) se recogieron y se procesaron para el 15 aislamiento de ARNm utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después del aislamiento, el ARN mensajero se purificó mediante tratamiento con DNasa (Sigma-Aldrich) a fin de eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico. La calidad del ARN se evaluó mediante análisis espectrofotométrico a 260 nm de longitud de onda, mientras que su pureza se determinó mediante la proporción de absorbancia A260/A280 a 1,8-2.

20 El ADNc (ADN complementario), que es necesario para el análisis de los niveles de expresión de TNF-alfa, se sintetizó por RT-PCR a partir de 5 μ g de ARN total aislado previamente. Se realizó la RT-PCR usando un enfoque de hexámeros aleatorios con el RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas Life Science), siguiendo las instrucciones del fabricante.

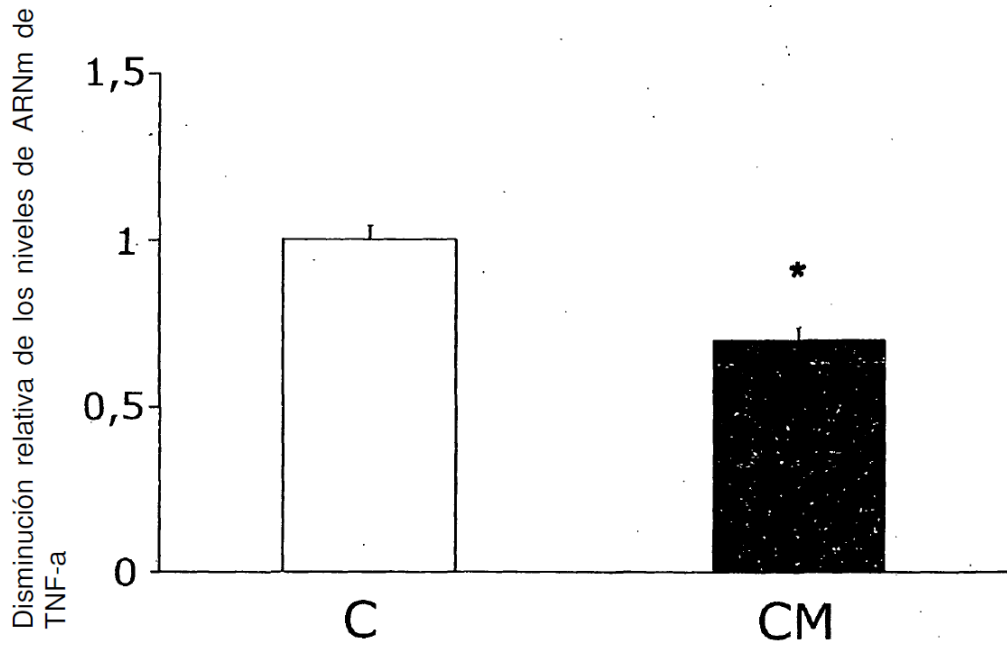
25 Las variaciones de los niveles de expresión génica de TNF-alfa después del tratamiento de los explantes vellosos por el medio acondicionado de la invención se evaluaron mediante PCR en tiempo real utilizando cebadores y sondas TaqMan (Applied Biosystem). Con el fin de realizar una cuantificación relativa, los datos de PCR en tiempo real se compararon entre los grupos tratados y de control después de normalizarse para 30 datos de subunidades ribosómicas 18S, usados como referencia interna.

Los resultados de la expresión génica, representados por el histograma en la figura 1 demuestran claramente que el tratamiento llevado a cabo usando el medio acondicionado (CM) de la invención condujo a una 35 reducción estadísticamente significativa de los niveles de TNF-alfa en explantes vellosos preeclámpicos tratados respecto a los controles (C) ($p = 0,015$).

REIVINDICACIONES

1. Un medio acondicionado obtenible cultivando una célula madre mesenquimatosa de la placenta recogida, después del parto, de la placenta de una mujer embarazada no afectada de preeclampsia en un medio de cultivo líquido, comprendiendo el medio acondicionado al menos los factores secretados por células interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1).
2. El medio acondicionado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un factor secretado por células adicional seleccionado del grupo que consiste en ENA-78, GCSF, GRO, GRO-alfa, IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, MCP-2, MCSF, MDC, ANGIOGENINA, ONCOSTATINA m, VEGF, BDNF, BLC, CKb 8-1, EOTAXINA 2, EOTAXINA 3, LIGANDO FLT-3, FRACTALCINA, GCP-2, GDNF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IP-10, LIF, LIGHT, MCP-4, MIF, MIP-3alfa, NAP-2, NT-3, OSTEOPONTINA, OSTEOPROTEGERINA, TGF-beta 2, TIMP-1, TIMP-2, RANTES, IGFBP-3, IL1b, IL-3, MIP-1b, PIGF, IL-1a, I309, FGF9, TARC, PDGF-bb, LEPTINA, TNF-a y cualquier combinación de los mismos.
3. El medio acondicionado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el factor secretado por células adicional es interleucina 8 (IL-8).
4. El medio acondicionado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula madre de la placenta tiene un origen coriónico o amniótico.
5. El medio acondicionado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que está libre de células.
6. Un método de preparación de un medio acondicionado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - (i) cultivar células madre mesenquimatosas de la placenta recogidas después del parto a partir de la placenta de una mujer embarazada no afectada de preeclampsia en un medio de cultivo basal líquido libre de suero durante al menos 3 horas;
 - (ii) separar la fracción celular del medio de cultivo líquido, obteniendo de este modo un medio acondicionado que comprende una combinación de factores secretados por dichas células madre mesenquimatosas de la placenta, comprendiendo dicha combinación al menos interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1).
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho medio acondicionado comprende un factor secretado por células adicional seleccionado del grupo que consiste en ENA-78, GCSF, GRO, GRO-alfa, IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, MCP-2, MCSF, MDC, ANGIOGENINA, ONCOSTATINA m, VEGF, BDNF, BLC, CKb 8-1, EOTAXINA 2, EOTAXINA 3, LIGANDO FLT-3, FRACTALCINA, GCP-2, GDNF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IP-10, LIF, LIGHT, MCP-4, MIF, MIP-3alfa, NAP-2, NT-3, OSTEOPONTINA, OSTEOPROTEGERINA, TGF-beta 2, TIMP-1, TIMP-2, RANTES, IGFBP-3, IL1b, IL-3, MIP-1b, PIGF, IL-1a, I309, FGF9, TARC, PDGF-bb, LEPTINA, TNF-alfa y cualquier combinación de los mismos.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que el factor secretado por células adicional es IL-8.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el tiempo de cultivo de las células madre mesenquimatosas de la placenta de una mujer embarazada no afectada de preeclampsia es de al menos 6 horas, o de al menos 12 horas, o de al menos 48 horas o de al menos 72 horas.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la fracción celular se separa del medio de cultivo líquido por filtración y/o por centrifugación.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que comprende adicionalmente la etapa iv) de aislar a partir del medio acondicionado obtenido en la etapa iii) uno o más de los factores secretados por dichas células madre mesenquimatosas de la placenta.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa iv) comprende aislar el factor IL-6, IL-10, MCP-1, ENA-78, GCSF, GRO, GRO-alfa, IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, MCP-2, MCSF, MDC, ANGIOGENINA, ONCOSTATINA m, VEGF, BDNF, BLC, CKb 8-1, EOTAXINA 2, EOTAXINA 3, LIGANDO FLT-3, FRACTALCINA, GCP-2, GDNF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IP-10, LIF, LIGHT, MCP-4, MIF, MIP-3alfa, NAP-2, NT-3, OSTEOPONTINA, OSTEOPROTEGERINA, TGF-beta 2, TIMP-1, TIMP-2, RANTES, IGFBP-3, IL1b, IL-3, MIP-1b, PIGF, IL-1a, I309, FGF9, TARC, PDGF-bb, LEPTINA, TNF-alfa o cualquier combinación de los mismos.
13. Un medio acondicionado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método de tratar terapéuticamente la preeclampsia.

14. El medio acondicionado para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, que está en una forma farmacéutica adecuada para la administración sistémica.
- 5 15. El medio acondicionado para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la forma farmacéutica es adecuada para su administración por inyección.



C = explantes preeclámpticos de la placenta tratados por medio de cultivo no acondicionado.

Cm = explantes preeclámpticos de la placenta tratados por medio de cultivo acondicionado por PDMSC fisiológicas

*= $p < 0,05$

FIG.1