

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 824**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**C12N 5/077** (2010.01)

**A61K 35/48** (2006.01)

**C12N 5/074** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013** **E 13156348 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016** **EP 2770050**

54 Título: **Población de células madre de cuello uterino humano y usos de la misma**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.06.2017**

73 Titular/es:

**GITEM RESEARCH S.L. (100.0%)**  
**Parque Científico y Tecnológico de Gijón, Edificio**  
**Pisa, C/ Ada Byron 107**  
**33203 Gijón, Asturias, ES**

72 Inventor/es:

**VIZOSO PIÑEIRO, FRANCISCO JOSÉ;**  
**PÉREZ FERNÁNDEZ, ROMÁN y**  
**EIRÓ DÍAZ, NOEMÍ**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 615 824 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

Población de células madre de cuello uterino humano y usos de la misma

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un método de aislamiento de células madre que comprende preparar una suspensión de células a partir de tejido de cuello uterino, a las células madre aisladas mediante dicho método, y al medio acondicionado obtenido a partir del cultivo de dichas células madre. La invención también engloba el uso de dichas células madre o medio acondicionado para el tratamiento o la prevención del cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, patologías crónicas o enfermedades infecciosas, así como para el tratamiento cosmético. Por lo tanto, la presente invención se refiere al campo de las células madre y el uso terapéutico o cosmético de las mismas.

15 **Técnica anterior**

Una célula madre se caracteriza por su capacidad de auto-renovarse y diferenciarse a lo largo de múltiples vías de linaje. Un tipo particularmente prometedor de células madre adultas para aplicaciones terapéuticas son las llamadas células madre mesenquimatosas (CMM). Las CMM, también definidas como células del estroma mesenquimatosas multipotentes, son una población heterogénea de células que proliferan *in vitro* como células adherentes al plástico, tienen morfología similar a fibroblastos, forman colonias *in vitro* y pueden diferenciarse en células del linaje mesodérmico, tales como osteocitos, condrocitos y adipocitos, así como en células de otros linajes embrionarios.

Se cree que las células madre residen en un nicho que regula el equilibrio entre la auto-renovación de las células madre y la regeneración tisular. El concepto de un nicho de células madre fue originalmente descrito con referencia a la hematopoyesis de los mamíferos, en la que el nicho representaba un microambiente especializado que alojaba la célula madre hematopoyética y que aseguraba su existencia continuada. Se propuso que las células de apoyo dentro del nicho, con sus productos de secreción, interaccionarían con y gobernarían el comportamiento de las células madre. Con el fin de apoyar la actividad de las células madre, según este modelo, las condiciones dentro del nicho serían propicias para mantener la quiescencia de las células madre en ausencia de cualquier señal de activación externa, pero promoverían la proliferación y maduración de las progenitoras en caso de necesidad, y también garantizarían la auto-renovación del conjunto de células madre.

Varios autores han informado de la presencia de diferentes poblaciones de células adultas multipotentes en tejidos blandos derivados del mesodermo embrionario. Por ejemplo, se ha informado que pueden obtenerse células multipotentes a partir de músculo esquelético y otro tejido conjuntivo de los mamíferos, a partir de tejido lipoaspirado humano o de la médula ósea [las llamadas células progenitoras adultas multipotentes (CPAM)]. En principio, todas estas poblaciones de células aisladas podrían usarse en la reparación y regeneración del tejido conjuntivo de una manera similar a las CMM de la médula ósea. Sin embargo, a excepción de las CPAM, ninguna de estas poblaciones ha sido, hasta la actualidad, suficientemente caracterizada a nivel del fenotipo. Por lo tanto, aunque se ha descrito la presencia de células adultas multipotentes en diferentes tejidos conjuntivos, en el estado de la técnica actual, no es posible identificar y distinguir de manera inequívoca entre diferentes tipos de células multipotentes obtenidas a partir de tejido blando, u obtener una población sustancialmente pura. Actualmente, la caracterización fenotípica de las células madre comprende la determinación de marcadores, tales como los receptores de la superficie celular, entre otros; y la determinación de su capacidad de diferenciación en cultivos *in vitro*. Cada tipo de célula tiene una cierta combinación de marcadores de superficie, es decir, tiene un determinado perfil de expresión que caracteriza a ese tipo de célula en particular, distinguiéndolo de los demás.

La fuente ideal de células madre adultas es una en la que puedan obtenerse mediante un proceso fácil, no invasivo, y una que permita aislar un número suficiente de células. En particular, una fuente debe proporcionar células madre que puedan ser fácilmente aisladas de un sujeto vivo sin riesgos y malestar significativos, y la fuente debe permitir la obtención de un alto rendimiento con la mínima contaminación de otros tipos de células, sin un coste excesivo de aislamiento y cultivo.

Aunque la médula ósea (MO) ha sido la principal fuente para el aislamiento de CMM multipotentes, el tejido adiposo es otra fuente de esta célula, pero la recogida de MO y tejido adiposo es un procedimiento altamente invasivo. Una fuente alternativa es la sangre del cordón umbilical, que puede obtenerse por un método menos invasivo, sin daño para la madre o el bebé. Se han identificado otras fuentes de CMM en una variedad de otros tejidos adultos humanos, incluyendo placenta, tejido del cuero cabelludo y células madre intestinales. Todas las células aisladas a partir de MO, tejido adiposo o sangre de cordón umbilical (SCU) presentaron características típicas de las CMM: una morfología fibroblastoide, la formación de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (UFC-F), una capacidad de diferenciación multipotencial, y la expresión de un conjunto típico de proteínas de superficie. Mientras que las CMM derivadas de las tres fuentes expresaron proteínas marcadoras de CMM clásicas, se observaron diferencias significativas en relación con la expresión de CD90, CD105 y CD106. Por lo tanto, las CMM podrían mostrar un fenotipo diferente en función de su fuente.

El proceso de obtención de médula ósea es doloroso y el rendimiento es muy bajo, siendo necesario un aumento sustancial del número de células por expansión *ex vivo* para obtener una cantidad clínicamente relevante. Esta etapa aumenta el coste y hace que el procedimiento requiera mucho tiempo, además de aumentar el riesgo de contaminación y la pérdida de material. Por estas razones, sería muy deseable ser capaz de aislar las células multipotentes a partir de tejidos mesenquimatosos distintos de la médula ósea. En particular, dada su accesibilidad quirúrgica, sería conveniente ser capaz de aislar células de tejidos mesodérmicos no osteocondrales tales como, pero no se limitan a, piel, grasa y tejido muscular.

Por lo tanto, existe la necesidad en el estado de la técnica de proporcionar una fuente alternativa de células madre mediante recogida no invasiva e indolora.

### Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto que puede usarse el tejido de cuello uterino como fuente de células madre. Las células aisladas a partir de este tejido, llamadas células madre de cuello uterino humano (CMCU), muestran una actividad antiinflamatoria, capacidad antitumoral, actividad antimicrobiana y tasa de crecimiento más altas que otras células madre mesenquimatosas aisladas de otros tejidos, y son capaces de mantener su funcionalidad y un cariotipo estable durante al menos 10 pases celulares. Adicionalmente, la nueva fuente de células madre permite el aislamiento de células madre mesenquimatosas por un método no invasivo e indoloro, ya que dicho tejido puede obtenerse simplemente exfoliando dicho órgano durante un examen ginecológico de rutina.

Basándose en esta nueva fuente de células madre y las células obtenidas a partir de la misma, los autores de la presente invención han desarrollado los siguientes aspectos inventivos que se desvelarán con detalle a continuación.

#### *Método de la invención*

Como se explicó anteriormente, los autores de la presente invención han descubierto que el tejido de cuello uterino puede usarse como fuente de células madre.

Así, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método de aislamiento de células madre, denominado en lo sucesivo el "método de la invención", que comprende:

- (a) Preparar una suspensión de células de tejido de cuello uterino,
- (b) recuperar las células de dicha suspensión de células,
- (c) incubar dichas células en un medio de cultivo celular adecuado en condiciones que permitan que las células proliferen, y
- (d) seleccionar las células madre.

Las etapas (a)-(d) pueden llevarse a cabo por técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Una ventaja adicional de esta nueva fuente de células madre es que permite la obtención de células madre a partir del cuerpo del animal de una manera no invasiva e indolora.

En el contexto de la presente invención, el término "no invasivo" se refiere a un proceso en el que no se rompe la piel y no se exploran las cavidades del cuerpo usando herramientas distintas de las herramientas habituales para un examen ginecológico. En el contexto de la presente invención, el término "indoloro" se refiere a un proceso que no causa dolor físico. Por lo tanto, el método de la invención es un método no invasivo e indoloro para el aislamiento de células madre, ya que la fuente de la que se aíslan dichas células madre es el cuello uterino.

Así, en una primera etapa [etapa (a)], el método de la invención comprende preparar una suspensión de células a partir de tejido de cuello uterino.

El término "tejido de cuello uterino" se refiere al tejido procedente del cuello uterino, es decir, el órgano que separa el cuerpo y la cavidad del útero de la vagina.

El tejido de cuello uterino puede obtenerse por cualquier método convencional conocido por una persona experta en la materia para la extracción de tejidos del cuerpo del animal, tanto métodos invasivos, tales como biopsia, como no invasivos, tales como la exfoliación del cuello uterino. Preferentemente, el tejido de cuello uterino se obtiene exfoliando el cuello uterino durante un examen ginecológico de rutina, que supone una manera no invasiva e indolora de obtener células madre. El tejido de cuello uterino puede obtenerse de cualquier mamífero adecuado, por ejemplo, una vaca, una oveja, un cerdo, un perro, un gato, un caballo, un primate, etc., preferiblemente seres humanos.

Una vez obtenido el tejido de cuello uterino, preferentemente el tejido se lava antes de ser procesado para separar las células de la invención del resto del material. En un protocolo, el tejido del cuello uterino se mantiene en una

solución salina fisiológicamente compatible (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS)) o en medio libre de suero. Debido a las características especiales del tejido de cuello uterino, en una realización particular, la etapa (a) del método de la invención consiste en desagregar enzimáticamente el moco cervical. Cualquier enzima capaz de desagregar el moco cervical puede usarse en el presente método (por ejemplo, colagenasa, dispasa, tripsina, etc.). La cantidad y la duración del tratamiento enzimático variarán, dependiendo de las condiciones empleadas, pero el uso de tales enzimas se conoce generalmente en la técnica. Alternativamente o junto con tal tratamiento enzimático, el moco cervical puede degradarse usando otros tratamientos, tales como agitación mecánica, energía sónica, energía térmica, etc. Si la degradación se realiza por métodos enzimáticos, es deseable neutralizar la enzima tras un período adecuado, para minimizar los efectos perjudiciales sobre las células.

La etapa de degradación normalmente produce una lechada o suspensión de células agregadas y una fracción de fluido que contiene células del estroma generalmente libres (por ejemplo, glóbulos rojos, células endoteliales, células de fibroblastos y células madre). La siguiente etapa [etapa (b)] en el método consiste en recuperar las células a partir de dicha suspensión de células, que significa separar las células agregadas del resto. Esto puede realizarse por centrifugación, que fuerza a las células en un sedimento cubierto por un sobrenadante. El sobrenadante puede entonces desecharse y suspenderse el sedimento en un fluido fisiológicamente compatible. Además, las células suspensas incluyen normalmente eritrocitos, y en la mayoría de los protocolos es deseable lisarlos. Los métodos de lisis selectiva de los eritrocitos son conocidos en la técnica, y puede emplearse cualquier protocolo adecuado (por ejemplo, incubación en un medio hiper o hipotónico, por lisis usando cloruro de amonio, etc.). Por supuesto, si se lisan los eritrocitos, entonces las células restantes deben separarse del lisado, por ejemplo mediante filtración, sedimentación, centrifugación o fraccionamiento por densidad. Las células suspensas pueden lavarse, volver a centrifugarse y suspenderse de nuevo una o más veces sucesivas para lograr mayor pureza. Alternativamente, las células pueden separarse basándose en el perfil de marcadores de superficie celular o basándose en el tamaño celular y la granularidad.

Tras la recuperación de las células de la suspensión celular, las células se cultivan en un medio de cultivo celular adecuado en condiciones que permitan que las células proliferen [etapa (c)]. Preferentemente, las células se cultivarán sin diferenciación, usando un medio de cultivo celular adecuado, a las densidades celulares y condiciones de cultivo apropiadas. Así, las células se cultivan sin diferenciación sobre una superficie sólida, en presencia de un medio de cultivo celular adecuado [por ejemplo, DMEM, DMEM-F12, alfa-MEM, RPMI, normalmente complementado con 5-25 % (por ejemplo, 20 %) de un suero adecuado, tal como suero fetal bovino, suero de ternera fetal, suero de ternera recién nacida, suero de ternera, suero porcino, suero ovino, suero de caballo, suero humano o factores, aminoácidos, etc. de suero humano], y se incuban en condiciones que permiten que las células proliferen. Las condiciones de cultivo, es decir, pH, temperatura, etc., son generalmente conocidas por una persona experta en la materia. Preferentemente, las células se cultivan sobre una superficie sólida y en condiciones que permiten que las células se adhieran a dicha superficie sólida y proliferen.

Como se usa en el presente documento, el término "superficie sólida" se refiere a cualquier material que permita que las células de la invención se adhieran. Por ejemplo, dicho material es un material de plástico, tal como placas de Petri o matraces de cultivo de células, tratados para promover la adhesión de células de mamíferos a su superficie, por ejemplo placas de poliestireno comercialmente disponibles, opcionalmente recubiertas con gelatina, fibronectina, poli-D-lisina u otros reactivos. Después de la incubación, las células se lavan con el fin de eliminar las células y los fragmentos de células no adheridos.

Una vez que las células proliferan, éstas pueden mantenerse en cultivo en el mismo medio y en las mismas condiciones hasta que alcanzan la confluencia adecuada, normalmente, aproximadamente el 80 % de confluencia celular, con el reemplazo del medio de cultivo celular cuando sea necesario. Después de alcanzar la confluencia celular deseada, las células pueden expandirse por medio de pases consecutivos usando un agente de desprendimiento tal como tripsina y siembra sobre una superficie de cultivo celular más grande a la densidad celular apropiada (normalmente 2.000-10.000 células/cm<sup>2</sup>). Así, las células se someten a pases al menos dos veces por tal medio sin diferenciarse, mientras que todavía retienen su fenotipo de desarrollo. Más preferentemente, las células pueden someterse a pases al menos 10 veces (por ejemplo, al menos 15 veces o incluso al menos 20 veces) sin perder el fenotipo de desarrollo. Normalmente, las células se siembran a una densidad deseada tal como entre aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup> y aproximadamente 100.000 células/cm<sup>2</sup> (tal como aproximadamente 500 células/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 50.000 células/cm<sup>2</sup>, o, más particularmente, entre aproximadamente 1.000 células/cm<sup>2</sup> y aproximadamente 20.000 células/cm<sup>2</sup>). Si se siembran a densidades más bajas (por ejemplo, aproximadamente 300 células/cm<sup>2</sup>), las células pueden aislarse más fácilmente por clonación. Por ejemplo, después de algunos días, las células sembradas a tales densidades proliferarán en una población homogénea.

Finalmente, el método comprende seleccionar las células madre [etapa (d)]. Las células madre pueden seleccionarse por un método convencional, tal como inmunocitoquímica (ICC), citometría de flujo, etc. La inmunocitoquímica es una técnica usada para evaluar la presencia de una proteína o antígeno específico en las células (células cultivadas, suspensiones de células) mediante el uso de un anticuerpo específico, que se une a la misma, permitiendo así la visualización y el examen en un microscopio. Como sabe el experto en la materia, las células que se desea teñir pueden unirse a un soporte sólido para permitir una manipulación fácil en los procedimientos posteriores, que puede lograrse por diversos métodos: pueden cultivarse células adherentes en

portaobjetos de microscopio, cubreobjetos, un soporte de plástico ópticamente adecuado, etc. Por otra parte, la citometría de flujo es una tecnología biofísica basada en láser empleada en el recuento de células, clasificación, detección de biomarcadores e ingeniería de proteínas, suspendiendo las células en una corriente de fluido y haciéndolas pasar por un aparato de detección electrónica. Un tipo especializado de citometría de flujo es la clasificación de células activadas por fluorescencia o FACS. Proporciona un método de clasificación de una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, una célula cada vez, basándose en las características de dispersión de la luz y de fluorescencia específicas de cada célula. Estos métodos son ampliamente conocidos por la persona experta en la materia, así como los marcadores celulares, por ejemplo, marcadores de superficie celular, para ser detectados con el fin de identificar o seleccionar células madre.

Si se desea, cualquiera de las etapas y procedimientos para aislar las células madre puede realizarse manualmente. Alternativamente, el proceso de aislamiento de dichas células puede facilitarse y/o automatizarse a través de uno o más dispositivos adecuados, ejemplos de los cuales se conocen en la técnica. El Ejemplo 1 describe de manera detallada el aislamiento de las células de la invención a partir de tejido de cuello uterino humano. Como resultado del método de la invención, se obtiene una población de células homogénea de células madre de cuello uterino.

Así, en la realización particular, las células madre aisladas:

- (a) expresan los marcadores celulares CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, vimentina, citoqueratina (CKAE1AE3), Klf4, Oct4 y Sox-2, y
- (b) no expresan al menos un marcador celular seleccionado del grupo que consiste en desmina, actina HHF35,  $\beta$ -catenina, p63, E-cadherina, CD117, CD133, HLA-DR, TRA1-81, CD45 y CD34.

La confirmación del fenotipo de interés puede llevarse a cabo usando medios convencionales. Pueden identificarse marcadores celulares, por ejemplo, marcadores de la superficie celular, mediante cualquier técnica convencional adecuada, normalmente basada en una selección positiva/negativa, por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales contra marcadores de la superficie celular, cuya presencia/ausencia en las células tiene que ser confirmada, aunque también pueden usarse otras técnicas.

Se usan anticuerpos monoclonales contra los marcadores celulares CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, vimentina, citoqueratina (CKAE1AE3), Klf4, Oct4 y Sox-2 con el fin de confirmar la presencia de dichos marcadores en las células seleccionadas (o niveles de expresión detectables de dichos marcadores), y se usan anticuerpos monoclonales contra al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 de los marcadores celulares seleccionados del grupo que consiste en desmina, actina HHF35,  $\beta$ -catenina, p63, E-cadherina, CD117, CD133, HLA-DR, TRA1-81, CD45 y CD34 y con el fin de confirmar la ausencia de los mismos. Dichos anticuerpos monoclonales son conocidos, están comercialmente disponibles o pueden ser obtenidos por una persona experta en la materia mediante métodos convencionales.

En otra realización particular, las células madre aisladas muestran además

- (a) una tasa de proliferación de 0,4 a 2,1 duplicaciones cada 24 horas en el medio de crecimiento,
- (b) una morfología similar a fibroblastos,
- (c) un cariotipo estable durante al menos 10, preferentemente 20 pases celulares,
- (d) capacidad de crecer en monocapa y de adherirse a un sustrato,
- (e) capacidad de diferenciarse en linajes endodérmicos, ectodérmicos o mesodérmicos, preferentemente un linaje celular adipogénico, osteogénico, neural o miocítico,
- (f) una capacidad no tumorigénica y/o
- (g) capacidad de formar esferas.

A continuación puede encontrarse una divulgación detallada de las células madre obtenidas por el método de la invención.

En vista de lo mencionado anteriormente, la persona experta en la materia entiende que se contempla como otro aspecto de la presente invención el uso de tejido del cuello uterino aislado, es decir, tejido extraído de su entorno original (cuello uterino) y así alterado "por la mano del hombre" con respecto a su estado natural, para la obtención de células madre de cuello uterino.

#### *Célula y medio acondicionado de la invención*

Como consecuencia de la puesta en práctica del método de la invención (descrito anteriormente), se obtiene una célula madre de cuello uterino.

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula madre de cuello uterino aislada, en lo sucesivo "célula de la invención", en el que dicha célula:

(a) expresa marcadores celulares CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, vimentina, citoqueratina (CKAE1AE3), Klf4, Oct4 y Sox-2, y

(b) no expresa al menos un marcador celular seleccionado del grupo que consiste en desmina, actina HHF35,  $\beta$ -catenina, p63, E-cadherina, CD117, CD133, HLA-DR, TRA1-81, CD45 y CD34.

5 En el contexto de la presente invención, el término "aislado" se refiere a una célula aislada del cuerpo humano o animal, que está sustancialmente libre de una o más células que están asociadas a dicha célula *in vivo* o *in vitro*.

10 La célula madre obtenida por el método de la invención expresa los marcadores celulares CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, vimentina, citoqueratina (CKAE1AE3), Klf4, Oct4 y Sox-2. En el contexto de la presente invención, se considera que una célula expresa un marcador celular cuando hay una "expresión significativa" del marcador celular analizado. Como se usa en el presente documento, la expresión "expresión significativa" significa que, en una población de células que comprende la célula de la invención, más del 10 %, preferentemente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 % o todas las células muestra una señal para un marcador celular específico en citometría de flujo o inmunocitoquímica por encima de la señal de fondo usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema Beckman Coulter Epics XL FACS o el sistema Dako Autostainer Plus usados con anticuerpos comercialmente disponibles y los protocolos estándares conocidos en la técnica). Para la citoqueratina (CKAE1AE3), una "expresión significativa" significa la presencia de una expresión focal. La señal de fondo se define como la intensidad de la señal dada por un anticuerpo no específico del mismo isotipo que el anticuerpo específico usado para detectar cada marcador superficial en un análisis FACS convencional. Así, para que un marcador se considere "presente" en la célula o positivo, la señal específica observada es más fuerte que el 10 %, preferentemente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 1000 %, 5000 %, 10000 % o superior, que la intensidad de la señal de fondo usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema Beckman Coulter Epics XL FACS usado con anticuerpos comercialmente disponibles y protocolos convencionales conocidos en la técnica).

Adicionalmente, la célula de la invención no expresa al menos un marcador celular seleccionado del grupo que consiste en desmina, actina HHF35,  $\beta$ -catenina, p63, E-cadherina, CD117, CD133, HLA-DR, TRA1-81, CD45 y CD34, es decir, son negativos para al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 de los siguientes marcadores desmina, actina HHF35,  $\beta$ -catenina, p63, E-cadherina, CD117, CD133, HLA-DR, TRA1-81, CD45 y CD34.

Como se usa en el presente documento, "negativo" con respecto a los marcadores celulares significa que, en una población de células que comprende la célula de la invención, menos del 10 %, preferentemente el 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o ninguna de las células muestra una señal para un marcador celular específico en citometría de flujo o inmunocitoquímica por encima de la señal de fondo, usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema Beckman Coulter Epics XL FACS o sistema Dako Autostainer Plus usados con anticuerpos comercialmente disponibles y protocolos convencionales conocidos en la técnica).

Ventajosamente, como se muestra en los ejemplos, la célula de la invención presenta otras características útiles. Así, en una realización particular, la célula de la invención muestra además, al menos una, preferentemente todas, de las siguientes características:

(a) Una tasa de proliferación de 0,4 a 2,1 duplicaciones cada 24 horas en el medio de crecimiento.

La alta tasa de crecimiento de las células de la invención permite la producción de células madre o medio acondicionado de forma rápida y en grandes cantidades. Esto ofrece la posibilidad de (i) llevar a cabo un gran número de experimentos con el fin de analizar la biología y los usos de estas células madre (esto se complica con las células madre mesenquimatosas actualmente conocidas en el estado de la técnica que muestran una tasa de crecimiento baja); (ii) una rápida regeneración de los tejidos ya que puede obtenerse un gran número de células madre en un corto periodo de tiempo; y (iii) obtener rápidamente una gran cantidad de células madre para su uso en terapias antiinflamatorias, antitumorales y antiinfecciosas.

(b) Una morfología similar a fibroblastos.

(c) Un cariotipo estable durante al menos 10, preferentemente 20 pases celulares, es decir, las células mantienen durante un tiempo el número y el aspecto de los cromosomas en el núcleo. Esto permite garantizar la funcionalidad de las células madre durante un largo periodo de tiempo, siendo posible producir un medicamento reproducible y eficaz a lo largo de los pases de células madre.

(d) La capacidad de crecer en monocapa y de adherirse a un sustrato.

(e) La capacidad de diferenciarse en linaje celular endodérmico, ectodérmico o mesodérmico, preferentemente, un linaje celular adipogénico, osteogénico, neural o miocítico. La capacidad de las células seleccionadas para diferenciarse en al menos uno de dichos linajes puede ensayarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica y la práctica común para el experto en la materia.

(f) Una capacidad no tumorigénica, es decir, no presentan un comportamiento alterado o fenotipo proliferativo que dé lugar a una célula tumoral.

(g) Capacidad de formar esferas, es decir, capacidad de formar un grupo o una colonia de células en un cultivo en suspensión, altamente proliferativo en presencia de factores mitogénicos (principalmente, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)). Esta capacidad representa una posible forma de conseguir *in vitro* similares a células progenitoras neurales.

En una realización particular, la célula de la invención es de un ser humano, preferentemente, de un ser humano en una fase no menstrual.

La persona experta en la materia entiende que la célula de la invención puede ser parte de una población de células. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una población celular aislada que comprende la célula de la invención, en lo sucesivo "población de células de la invención".

El término "aislado" aplicado a una población de células se refiere a una población de células aislada del cuerpo humano o animal, que está sustancialmente libre de una o más poblaciones de células que están asociadas con dicha población de células *in vivo* o *in vitro*.

Las células o la población de células proporcionada por la presente invención pueden expandirse de forma clonal, si se desea, utilizando un método adecuado para la clonación de poblaciones de células. Por ejemplo, una población proliferada de células puede recogerse físicamente y sembrarse en una placa separada (o el pocillo de una placa de múltiples pocillos). Alternativamente, las células pueden subclonarse en una placa de múltiples pocillos a una proporción estadística para facilitar la colocación de una única célula en cada pocillo. Por supuesto, las células pueden clonarse sembrándolas a baja densidad (por ejemplo, en una placa de Petri u otro sustrato adecuado) y aislándolas de otras células usando dispositivos tales como anillos de clonación. La producción de una población clonal puede expandirse en cualquier medio de cultivo adecuado. En cualquier caso, las células aisladas pueden cultivarse hasta un punto adecuado cuando pueda evaluarse su fenotipo de desarrollo.

Además de la célula madre de cuello uterino, la presente invención también contempla el medio acondicionado obtenido a partir del cultivo de dicha célula. Como entiende la persona experta en la materia, puede usarse medio acondicionado en lugar de las propias células debido a este medio acondicionado proporciona los múltiples compuestos secretados por las células de la invención.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un medio acondicionado, en lo sucesivo "medio acondicionado de la invención", obtenido por un método que comprende:

- (a) Incubar la célula madre aislada de la invención o la población de células de la invención, y
- (b) Extraer las células del medio de cultivo.

Como se usa en el presente documento, el término "medio acondicionado" se refiere a los medios gastados recogidos a partir de las células cultivadas, es decir, de las células cultivadas de la invención (células madre de cuello uterino). El medio acondicionado contiene metabolitos, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular secretadas al medio por las células cultivadas. Ejemplos de cada componente incluyen, pero no se limitan a, metabolitos tales como glucosa, aminoácidos, nucleósidos, etc.; factores de crecimiento, tales como interleucinas, EGF (factor de crecimiento epidérmico), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), etc.; y proteínas de la matriz tales como colágeno, fibronectina, diversos proteoglicanos, etc.

El medio acondicionado de la invención se produce cultivando la célula aislada de la invención en condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para que las células secreten los compuestos activos en el medio. Medios de cultivo celular adecuados para cultivar las células de la invención comprenden, por ejemplo, DMEM, DMEM-F12 o alfa-MEM, RPMI, normalmente complementado con 5-25 % (por ejemplo, 20 %) de un suero adecuado, tal como suero bovino fetal, suero de ternera fetal, suero de ternera recién nacida, suero de ternera, suero porcino, suero ovino, suero de caballo, suero humano o factores, aminoácidos, etc. de suero humano. Las condiciones de cultivo, es decir, pH, temperatura, etc., son generalmente conocidas por la persona experta en la materia. Por otro lado, el cultivo de las células puede llevarse a cabo usando un biorreactor, que permite tanto la gestión de un gran volumen de medio como un entorno controlado adecuado para las células. Los biorreactores son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y su uso es rutinario para la persona experta.

Después del cultivo, el medio se procesa entonces para eliminar las células. Esto puede hacerse por cualquier método convencional, por ejemplo, decantación, centrifugación, filtración, etc. Entonces, el sobrenadante se recoge como medio acondicionado y se mantiene a 4 °C, -20 °C, -80 °C, u otra condición que pueda conservar su funcionalidad o pueda usarse inmediatamente.

#### *Usos de la célula de la invención*

Una vez se aísla la célula de la invención, tanto la célula como el medio acondicionado obtenido de ella puede usarse para la fabricación de una composición farmacéutica.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una célula madre aislada, una población de células, o el medio acondicionado de la invención, en lo sucesivo "composición farmacéutica de la invención", y un vehículo y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la invención comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una célula de la invención, una población de células, o el medio acondicionado de la invención. Así, el término “cantidad terapéutica” o “profilácticamente eficaz” se refiere a la cantidad de agente capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas. Se calcula que produce el efecto deseado y generalmente se determinará, entre otras cosas, combinando las características de los compuestos y pacientes, incluyendo la edad, estado del paciente, gravedad de la alteración o trastorno, y la vía y frecuencia de la administración.

El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa que el vehículo está aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o se enumera en la Farmacopea de los EE.UU. o Farmacopea Europea, u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes de tamponamiento del pH. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E.W. Martin (18ª edición, Mack Publishing Co.). Tales composiciones contendrán una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de la célula de la invención, o una población de células de la invención preferentemente en forma purificada, o un medio acondicionado de la invención, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al sujeto. La formulación debería adaptarse al modo de administración. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son estériles y en forma adecuada para la administración a un sujeto, preferiblemente un sujeto animal, más preferiblemente un sujeto mamífero, y más preferentemente un sujeto humano.

La composición farmacéutica de la invención puede estar en una variedad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólidas, semisólidas y líquidas, tales como preparaciones liofilizadas, disoluciones o suspensiones líquidas, disoluciones inyectables e infundibles, etc. La forma preferida depende del modo de administración y aplicación terapéutica previstos.

La administración de la célula o la población de células o el medio acondicionado de la invención, o la composición farmacéutica que comprende el mismo, al sujeto en necesidad de la misma puede llevarse a cabo por medios convencionales. Preferiblemente, dicha célula o población de células se administra al sujeto por un método que implica la transferencia de las células al tejido deseado, tanto *in vitro* como *in vivo*, directamente al tejido animal. La célula o el medio acondicionado pueden transferirse al tejido deseado por cualquier método apropiado, que generalmente variará según el tipo de tejido. Por ejemplo, las células pueden sembrarse en el sitio deseado dentro del tejido para establecer una población, etc. Las células o el medio acondicionado pueden transferirse a sitios *in vivo* usando dispositivos tales como catéteres, trocates, cánulas, prótesis endovasculares, hilo de sutura (que puede sembrarse con las células o empaparse en medio acondicionado), etc.

Como se muestra en los ejemplos, la célula de la invención puede usarse para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a trastornos en los que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa, que incluye, pero no se limita a, trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inmunológicamente mediadas, incluyendo el rechazo de órganos y tejidos trasplantados, patologías crónicas y enfermedades infecciosas. Además, debido a la capacidad antitumoral, también pueden usarse para el tratamiento o la prevención de cáncer.

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención para uso como un medicamento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, patologías crónicas o enfermedades infecciosas.

Como se usa en el presente documento, “tratamiento”, “tratar” o “tratando” se refiere a: (a) prevenir que se produzca la enfermedad o afección en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o afección, pero que aún no ha sido diagnosticado con la misma; (b) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo; (c) aliviar y o mejorar la enfermedad o afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o afección; o (d) curar la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo o progresión. La población de sujetos tratados por la célula madre, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención incluye a los sujetos que sufren la afección o enfermedad no deseable, así como sujetos en riesgo de desarrollar la afección o enfermedad. En la presente invención, las enfermedades a tratar se seleccionan de cáncer, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad mediada inmunológicamente, incluyendo el rechazo de órganos y tejidos trasplantados, una patología crónica y una enfermedad infecciosa.

Los términos “trastorno” y “enfermedad” se usan indistintamente para referirse a una afección en un sujeto.

El término “cáncer” se refiere a una clase de enfermedad causada por un fallo de los controles que normalmente gobiernan la proliferación celular, diferenciación y la supervivencia celular, dando lugar a células que se someten a la transformación maligna (también llamadas células cancerosas o células tumorales), invadiendo el tejido

circundante (y formando un tumor maligno), y que puede migrar en última instancia a otros sitios en el cuerpo para establecer tumores secundarios en un proceso denominado metástasis. Además, en el contexto de la presente invención, el término “tumor” se refiere a masas de tejido anormal, e incluye tanto masas benignas como malignas. Las masas de tejidos benignos también pueden tratarse con las células, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención.

Cánceres a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer anorrectal, cáncer del conducto anal, cáncer del apéndice, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, carcinoma de células basales, cáncer biliar, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de huesos y articulaciones, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, cáncer cerebral, tumor cerebral, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de la vía visual e hipotalámico, cáncer de mama, adenomas bronquiales/carcinoides, tumor carcinoide, cáncer gastrointestinal, cáncer del sistema nervioso, linfoma del sistema nervioso, cáncer del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, cáncer de cuello de útero, cánceres infantiles, leucemia linfocítica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de linfocitos T, neoplasia linfoide, micosis fungoide, síndrome de Sezary, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, tumores de células germinales de ovario, tumor trofoblástico gestacional, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer de la hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer ocular, tumores de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia de células pilosas, cáncer del labio y la cavidad bucal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no Hodgkin, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenström, meduloblastoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma maligno, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello, cáncer de boca, cáncer de lengua, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de orofaringe, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, cáncer pancreático de células de los islotes, cáncer de los senos paranasales y de la fosa nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor pituitario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer de recto, pelvis renal y uréter, cáncer de células de transición, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de la glándula salival, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel de células de Merkel, cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de la pelvis renal y uréter y otros órganos urinarios, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de uretra, sarcoma uterino, cáncer de cuerpo uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva y tumor de Wilms.

El término “enfermedad inflamatoria” se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por la inflamación, por ejemplo, inflamatoria crónica. Ejemplos no limitantes ilustrativos de trastornos inflamatorios que pueden tratarse con la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), asma, encefalitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), osteólisis inflamatoria, trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), vasculitis inflamatorias (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, arteritis temporal y granulomatosis linfomatoide), angioplastia postraumático vascular (por ejemplo, reestenosis posterior a angioplastia), espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria, hepatitis crónica e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas.

El término “enfermedad autoinmunitaria” se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por lesiones celulares, tisulares y/o de órganos causadas por una reacción inmunológica del sujeto contra sus propias células, tejidos y/u órganos. Ejemplos no limitantes ilustrativos de enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse con la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención incluyen alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria y orquitis, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, dermatitis por celiacía, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmune (SFCDI), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad por crioglobulinas, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis,

glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1 o diabetes mellitus inmunomediada, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, sarcoidosis, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjogren, síndrome de Goodpasture, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis por dermatitis herpetiforme, vitiligo, granulomatosis de Wegener, etc.

El término “patología crónica” se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por una enfermedad de larga duración, estable o con una progresión lenta, constantemente presente o que entra en remisión y recaída periódicamente. Ejemplos no limitantes ilustrativos de enfermedades crónicas que pueden tratarse con la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención incluyen enfermedad cardiovascular, enfermedad cardíaca, accidente cerebrovascular, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas tales como, pero no se limitan a, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, artrosis, obesidad, VIH/SIDA, caries dentales, enfermedad periodontal, infecciones crónicas del oído, glaucoma e infección viral o bacteriana crónica

El término “enfermedad infecciosa” se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por la presencia en el organismo de un microorganismo patógeno, tal como bacterias, virus, parásitos u hongos. Ejemplos no limitantes ilustrativos de enfermedades infecciosas que pueden tratarse con la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención incluyen gripe, gripe aviar, VIH/SIDA, legionelosis, septicemia, tuberculosis, úlcera de Buruli, tripanosomiasis, fiebre hemorrágica (por ejemplo, fiebre hemorrágica de Marburgo, fiebre hemorrágica del Ébola o fiebre del dengue hemorrágico), hepatitis (por ejemplo, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C), meningitis (por ejemplo, meningitis meningocócica), cólera, fiebre amarilla, malaria, lepra.

El término “sujeto” en las definiciones anteriormente mencionadas se refiere a cualquier animal, que incluye, pero no se limita a, mamíferos, preferentemente primates, más preferentemente seres humanos. Así, la célula madre aislada, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención pueden utilizarse en el tratamiento de cualquier animal que padezca las enfermedades anteriormente mencionadas.

La presente invención también contempla la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención para su uso en una terapia de combinación para la prevención o el tratamiento de cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, patologías crónicas o enfermedades infecciosas.

El término “terapia de combinación” se refiere al uso de la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención con otros agentes activos o modalidades de tratamiento, a la manera de la presente invención para la mejora de uno o más síntomas asociados a un trastorno que incluye, pero no se limita a, cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, patologías crónicas, enfermedades infecciosas o una enfermedad mediada inmunológicamente que incluye rechazo de órganos y tejidos trasplantados.

Estos otros agentes o tratamientos pueden incluir fármacos y terapias conocidas para el tratamiento de tales trastornos. La célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención también pueden combinarse con corticosteroides, compuestos antiinflamatorios no esteroideos, u otros agentes útiles en el tratamiento de cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, patologías crónicas. El uso combinado de los agentes de la presente invención con estas otras terapias o modalidades de tratamiento puede ser simultáneo o administrarse de forma secuencial, es decir, los dos tratamientos pueden ser divididos de tal manera que una población de células o una composición farmacéutica que comprende la misma de la presente invención pueda administrarse antes o después de la otra terapia o modalidad de tratamiento. El médico tratante puede decidir sobre la secuencia apropiada de administración de la población de células, o una composición farmacéutica que comprende la misma, en combinación con otros agentes, terapia o modalidad de tratamiento.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención para su uso en un tratamiento cosmético.

En la presente invención el término “tratamiento cosmético” se refiere al tratamiento para mejorar el aspecto de la piel, por ejemplo mejorando la textura de la piel, en particular para la aplicación a piel envejecida, en particular a pieles con marcas, con arrugas y/o con hoyuelos (celulitis). En este caso, la preparación cosmética se formula preferentemente como crema, loción, gel o cera, y puede comprender un compuesto para mejorar el efecto cosmético. La preparación cosmética se aplica preferentemente por vía cutánea, subcutánea o percutánea, tanto por vía tópica, transdérmica, intradérmica como interepidérmica. Ventajosamente, la célula madre, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención pueden aplicarse tan fácilmente como un relleno cosmético, conocido del estado de la técnica. La preparación de células madre también puede

inyectarse en varios puntos en la zona donde va a mejorarse la textura de la piel, por ejemplo alrededor y/o debajo de la piel con marcas, con arrugas y/o con hoyuelos, preferentemente 200 µl a 2 ml, lo más preferentemente 0,5 ml a 2 ml por punto.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a una célula madre aislada, una población celular, un medio acondicionado o una composición farmacéutica de la invención para inhibir o disminuir la proliferación y/o la metástasis de las células tumorales, la diferenciación monocítica, el crecimiento y/o replicación de microorganismos patógenos, o la proliferación de células mononucleares de sangre periférica, o para mejorar o inducir la apoptosis de células tumorales.

10 El término "inhibir" o "inhibición" de la proliferación y/o metástasis de las células tumorales se refiere a parar, bloquear o prevenir, respectivamente, la división celular de una célula tumoral, o a detener, bloquear o prevenir la propagación de una célula tumoral desde un órgano o parte a otro órgano o parte no adyacente. Análogamente, el término "disminución" de la proliferación y/o metástasis de las células tumorales se refiere, respectivamente, a  
15 reducir la división celular de una célula tumoral, o a reducir la propagación de una célula tumoral de un órgano o parte a otro órgano o parte no adyacente.

El término "inhibir" o "inhibición de la diferenciación monocítica y/o la proliferación de células mononucleares de sangre periférica" se refiere a parar, bloquear o prevenir, respectivamente, la diferenciación de monocitos en macrófagos, o a detener, bloquear o prevenir la división celular de las células mononucleares de sangre periférica. Análogamente, el término "disminución de la diferenciación monocítica y/o proliferación de células mononucleares de sangre periférica" se refiere, respectivamente, a reducir la diferenciación de monocitos en macrófagos, o a reducir la división celular de las células mononucleares de sangre periférica.

20 El término "inhibir" o "inhibición del crecimiento y/o replicación de microorganismos patógenos" se refiere a parar, bloquear o prevenir la división celular del microorganismo. Como consecuencia, el número de microorganismos disminuye o permanece constante.

La expresión "aumento de la apoptosis de las células tumorales" es similar a "inducir la apoptosis de las células tumorales" y las dos significan aumentar o provocar el proceso de muerte celular programada de células tumorales. Los métodos para medir la inhibición o disminución de la proliferación y/o la metástasis de las células tumorales, la diferenciación monocítica, el crecimiento y/o la replicación de microorganismos patógenos, o la proliferación de células mononucleares de sangre periférica se muestran en los ejemplos de la presente descripción, además de métodos para comprobar si la apoptosis de las células tumorales se potencia o induce. Todos estos métodos son  
30 ampliamente conocidos en el estado de la técnica y son una práctica común para el experto.

Por otra parte, la presente invención también contempla un kit que comprende la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención, además del uso de dicho kit para el tratamiento o la prevención de cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, patologías crónicas o enfermedad infecciosa, y para inhibir o disminuir la proliferación y/o la metástasis de células tumorales, la diferenciación monocítica o la proliferación de células mononucleares de sangre periférica, o para potenciar o inducir la apoptosis de células tumorales. La invención también engloba el uso del kit de la invención para fines cosméticos.

Además, los correspondientes métodos de tratamiento equivalentes a los usos de la célula, la población de células, el medio acondicionado o la composición farmacéutica de la invención desvelada en el presente documento también se contemplan en el contexto de la presente invención.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica de la presente invención. En toda la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos, dibujos y listado de secuencias se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

#### Breve descripción de los dibujos

60 **Figura 1: Células madre del cuello uterino muestran un fenotipo inmune de células madre mesenquimatosas adultas.** **A.** Las células obtenidas de frotis cervical y cultivadas durante 90 días se inmunomarcaron con anticuerpos específicos y luego se evaluaron para la expresión de proteínas. No se detectaron expresión de desmina, actina HHF35, actina de músculo liso, p63 y E-cadherina, mientras la CKAE1AE3 se expresó focalmente, y la vimentina mostró una expresión fuerte. **B.** Los marcadores de células madre específicas tales como klf4, oct4 y sox2 mostraron un fuerte inmunomarcado en las células madre de cuello uterino. **C.** Los análisis de citometría de flujo de las células madre de cuello uterino humano (CMCUh)

indican un alto porcentaje de las proteínas CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, pero la expresión negativa de las proteínas CD31, CD34, CD45, CD117, CD133, HLA-DR y Tra1-81. **D.** Las CMCUh aisladas forman esferoides cuando se cultivan en medio específico.

5 **Figura 2: Tasa de crecimiento de CMCUh.** El crecimiento de las CMCUh se expresó como el número de células después de la siembra de 2.000 células/pocillo.

10 **Figura 3: Ensayo de inmunogenicidad.** La figura muestra un ejemplo representativo de MLR de dos donantes. La proliferación de CMSP se determinó en ausencia de células estimuladoras, en presencia de CMSP tratadas con mitomicina C autóloga (control negativo), en presencia de CMSP tratadas con mitomicina C alógena (control positivo), en presencia de CMCUh tratadas con mitomicina C y CMSP estimuladas con Con A (control positivo). Las células estimuladoras se probaron a una densidad de  $2 \times 10^4$  por pocillo. Se realizaron ensayos de MLR unilaterales para evaluar la inmunogenicidad de las CMCUh. La proliferación de CMSP se midió basándose en el aumento del número de células vivas metabólicamente activas en presencia de células estimuladoras tratadas con mitomicina C. Las CMSP autólogas y alógenas sirvieron de controles de células estimuladoras negativas y positivas, respectivamente. Las CMSP estimuladas con Con A sirvieron de otras células de control de estimulación positivas. Las CMSP no indujeron la proliferación de linfocitos T en ensayos de MLR.

20 **Figura 4: Inhibición de la diferenciación monocítica con estimulación en presencia de medio acondicionado de CMCUh.** **A)** La viabilidad de las células U937 es superior al 80 %. **B)** Efecto del medio acondicionado de CMCUh y CEA en la expresión de un marcador de diferenciación de macrófagos. El nivel basal de expresión de CD11b de U937 es del 34 %. En comparación con las células U937 de control tratadas con PMA, el porcentaje de células teñidas positivas para CD11b disminuyó del 73 % en células U937 tratadas con PMA al 48 % en células U937 tratadas con medio acondicionado de CMCUh. El porcentaje de expresión de CD11b para las células U937 tratadas con medio acondicionado de CEA es del 67 %.

30 **Figura 5: Inhibición de la diferenciación monocítica: estimulación durante 24 horas y adición de medio acondicionado de CMCUh.** **A)** La viabilidad de las células U937 es superior al 80 %. **B)** El nivel basal de la expresión CD11b de U937 es del 38 %. En comparación con las células U937 de control tratadas con PMA, el porcentaje de células teñidas positivas para CD11b disminuyó del 82 % en células U937 tratadas con PMA al 48 % en células U937 tratadas con medio acondicionado de CMCUh producido durante 24 horas (MA 24 horas) y al 34 % en células U937 tratadas con medio acondicionado producido durante 48 horas (MA 48 horas). Sin embargo, la expresión de CD11b en células U937 tratadas 48 horas con MA de CEA es del 77 %.

35 **Figura 6: Inhibición de la proliferación de CMSP con medio acondicionado.** Tanto medio acondicionado 24 horas como 48 horas suprimió la proliferación de CMSP. La supresión es más eficaz con el medio acondicionado de CMCUh que con el medio acondicionado de CEA. La magnitud de supresión por el medio acondicionado de CMCUh superó a la de la dexametasona.

40 **Figura 7: El medio acondicionado de CMCUh reduce la proliferación celular en las células HT29, AGS y MDA-MB-231, pero no en la línea celular MCF-7.** **A.** Ensayo de proliferación celular de la línea celular de adenocarcinoma colorrectal (HT29) y gástrico (AGS) tratada durante 48 horas con medio completo (control), medio incompleto (sin FBS), medio acondicionado de CMCUh producido durante 24 horas o 48 horas y medio acondicionado de CEA producido durante 48 h. **B-C.** Ensayo de MTT de las células MCF-7 tratadas durante 24 o 48 horas con medio completo (+ FBS), medio incompleto (- FBS), medio acondicionado de células MCF-7 producido durante 24 o 48 horas, o medio acondicionado a partir de CMCUh producido durante 24 o 48 horas. **D-E.** Ensayo de MTT de las células MDA-MB-231 tratadas durante 24 o 48 horas con medio completo (+ FBS), medio incompleto (- FBS), medio acondicionado de células MDA-MB-231 producido durante 24 o 48 horas, o medio acondicionado de CMCUh producido durante 24 o 48 horas. **F.** Las células MCF-7 ( $1 \times 10^5$ ) se marcaron con el colorante CellTracker Green y se sembraron en placas de 6 pocillos. Cuatro horas después, se añadieron  $1 \times 10^5$  CMCUh marcadas con el colorante CellTracker Red a las células MCF-7 y se co-cultivaron en medio incompleto (sin FBS) durante 72 horas. Se tomaron imágenes a las 12, 48 y 72 horas. La última línea muestra un ejemplo de crecimiento de células MCF-7 en medio incompleto (-FBS), que se usó como control del crecimiento. **G.** Las células MDA-MB-231 se marcaron y se co-cultivaron con CMCUh como se describe en (F) para las células MCF-7.

60 **Figura 8: La administración de medio acondicionado (MA) de CMCUh a células MDA-MB-231 retrasa el ciclo celular y aumenta la apoptosis.** **A.** Se trataron células MDA-MB-231 durante 48 horas con DMEM más 10 % de FBS (+ FBS), medio incompleto (DMEM sin FBS, - FBS), o MA de 48 horas de CMCUh, y entonces se sometieron a citometría de flujo usando yoduro de propidio (PI). Se muestra el porcentaje de células (media  $\pm$  desviación estándar) en cada fase. **B.** Transferencia Western de la ciclina A, ciclina B, ciclina E, ciclina D1 y GAPDH (usado como control de carga) de extractos de proteínas de células MDA-MB-231 tratadas durante 48 horas como se describe en (A). **C.** La apoptosis se determinó en células MDA-MB-231 cultivadas durante 48 horas con medio completo (+ FBS), incompleto (- FBS) o MA de CMCUh por citometría de flujo usando anexina V/PI. La anexina V+/PI- y la anexina V+/PI+ indican la apoptosis temprana y tardía, respectivamente. **D.** Transferencia Western de la caspasa 8, -12, -9, caspasa 3 activada y PARP escindida de extractos de proteínas

MDA-MB-231 como se indica en (C). **E.** Transferencias Western de Bid antiapoptósica, Bid escindida y proteínas Bim en extractos de MDA-MB-231 tratados como en (C). Se usó GAPDH como control de carga.

**Figura 9: El medio acondicionado (MA) de CMCUh inhibe la invasión, el crecimiento 3D y el volumen tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón.** **A.** El MA de 48 horas de CMCUh disminuyó significativamente la invasión de células MDA-MB-231 a través de una matriz de Matrigel, en comparación con las células con medio incompleto (-FBS, control). **B.** La administración de MA de 48 horas de cultivo de CMCUh durante 9 días reduce significativamente el crecimiento 3D de las células MDA-MB-231, en comparación con las células tratadas con medio completo (+FBS) o incompleto (-FBS). **C.** Se inyectaron trece ratones SCID con células MDA-MB-231-luc en el pániculo adiposo mamario. Quince días después, se inyectaron por vía intratumoral siete ratones cada cinco días con 150 µl de medio acondicionado (MA) de CMCUh (tratadas con MA) y se inyectaron seis ratones con medio incompleto (-FBS, controles). Se tomaron imágenes representativas de los controles y los ratones tratados con MA a los 15, 20, 25 y 30 días. **D.** El volumen del tumor se determinó midiendo la luminiscencia. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de los niveles de luminiscencia relativa. \*\*:  $P = 0,011$  frente a controles. **E.** Detección inmunohistoquímica de la expresión activada por caspasa-3 en los tumores representativos de ratones SCID tratados con MA y placebo, como se describe en (C). **F.** Gráficas de Kaplan-Meier de supervivencia global en los ratones tratados con MA frente a ratones de control. Los ratones tratados con MA tenían una larga DFS en comparación con los ratones de control. La diferencia fue estadísticamente significativa ( $P = 0,019$ ).

**Figura 10: La proliferación celular en cultivos primarios de tumores de mama con alta tasa de proliferación se reduce significativamente después de la administración de medio acondicionado (MA) de CMCUh.** **A.** Se trataron diez cultivos primarios de tumores de mama humanos con: a) medio completo (+FBS), b) medio incompleto (-FBS), c) medio acondicionado (MA) producido durante 48 horas por las propias células, d) MA producido durante 48 horas por las células del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA), y e) MA producido durante 48 horas por CMCUh. Después de 48 horas de cultivo, se llevó a cabo un ensayo de MTT para evaluar la proliferación celular. Los cultivos con alta tasa de proliferación (11B512, 11B3285, 11B3171 y 11B7352, en rojo) mostraron una disminución significativa (\*\*\*:  $P < 0,001$ ) en la proliferación después del tratamiento con MA de CMCUh, en comparación con otros tratamientos. **B.** Los extractos de proteínas de cultivos primarios con alta tasa de proliferación tratados con MA de CMCUh o con medio incompleto (-FBS) se incubaron con anticuerpos contra ciclina D1, PARP escindida y GAPDH (usados como control de carga) y se ensayaron para transferencia Western.

**Figura 11: Ejemplo representativo de la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos por medio acondicionado de CMCUh.** **A.** El medio de control (M) mostró un crecimiento de *E. coli*, y el medio acondicionado de CMCUh (1) mostró una inhibición del crecimiento bacteriano hasta el pocillo 4 (dilución 1/20). Crecimiento bacteriano del medio acondicionado de CMM derivadas de tejido adiposo en todos los pocillos. **B.** Tabla de volúmenes añadidos en pocillos para cada estado. Los círculos indican los pocillos que muestran inhibición del crecimiento bacteriano.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de células madre de cuello uterino humano

#### I - Material y métodos

##### *Aislamiento y crecimiento de células madre de cuello uterino humano*

Se obtuvieron células madre de cuello uterino humano (CMCUh) de una exfoliación del cuello uterino durante un examen ginecológico rutinario. Brevemente, se desagregó enzimáticamente la muestra citológica con tripsina, colagenasa u otra enzima que pudiera desagregar el moco cervical. Entonces, la muestra se centrifugó 5 minutos a 400 g y el sedimento se recogió y se sembró en una placa de cultivo. El pocillo puede recubrirse previamente con 1 % de gelatina o fibronectina u otro sustrato para permitir la adherencia. La muestra se cultivó en medio Eagle modificado por Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12 (DMEM-F12), glutamina, con o sin antibióticos, con suero, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hidrocortisona, insulina, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio. El subcultivo de las células se llevó a cabo con tripsina o Accutase u otras enzimas proteolíticas y/o colagenolíticas.

##### *Caracterización por citometría de flujo*

Se tiñeron células madre de cuello uterino humano (CMCUh) con un panel de anticuerpos monoclonales específicos: CD29-PE, CD45-FITC, CD90-PE, CD105-PE, HLA-DR-PE (Beckman Coulter), CD44-PE, CD73-PE, CD31-PE, TRA1-81-FITC (Becton Dickinson, Biosciences Pharmingen), CD34-FITC, CD117-PE y CD133-PE (Miltenyi Biotec). Se añadió 7-amino-actinomicina-D (7-AAD) (BD Pharmingen) para la discriminación de células muertas. La inmunofenotipificación se realizó en las mismas células separadas en alícuotas iguales en diferentes tubos. Las células teñidas se resuspendieron en PBS y se analizaron usando un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Los datos calculados se analizaron utilizando el software CXP proporcionado por el fabricante.

*Caracterización inmunocitoquímica*

Se cultivaron células madre de cuello uterino humano (CMCUh) como se describió anteriormente. Se sembraron  $3 \times 10^4$  células en portaobjetos, y se fijaron durante 10 minutos en etanol al 96 %, antes de procesarlas para inmunocitoquímica. Los tumores de ratón se fijaron por inmersión en formalina tamponada neutra al 10 % durante 24 horas y se sumergieron en parafina rutinariamente.

Se montaron secciones de 4  $\mu$ m de espesor en portaobjetos de microscopio Flex IHC (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se realizaron de forma automática técnicas inmunohistoquímicas (IHC) en un AutostainerLink 48 (Dako). Se emplearon los anticuerpos primarios Dako listos para usar de FLEX para CK (clon AE1/AE3), E-cadherina (clon NCH-38), vimentina (clon V9), desmina (clon D33), actina (clon HHF35), actina de músculo liso (clon 1A4) y  $\beta$ -catenina (clon beta-catenina-1). También se usó un anticuerpo monoclonal listo para usar contra p63 (clon 4A4) de Abcam (Cambridge, RU). Los anticuerpos primarios contra KLF4, Oct4 y Sox2 se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Millipore, y Sigma-Aldrich, respectivamente. La recuperación del epítipo se realizó en un horno de microondas 20 minutos usando una solución de recuperación de diana EnVision FLEX (pH 9). Todos los anticuerpos se incubaron durante 20 minutos a TA, excepto p63 que se incubó durante 30 minutos. Como sistema de detección los presentes inventores usaron EnVision FLEX/HRP Dako (polímero de dextrano conjugado con peroxidasa de rábano picante e inmunoglobulinas anti-ratón y anti-conejo de cabra aisladas por afinidad) durante 20 minutos. Para E-cadherina se añadió un conector de ratón (Dako).

*Tasa de crecimiento*

Se determinó la tasa de proliferación de CMCUh contando el número total de células en pocillos duplicados cada día durante 12 días. Inicialmente, las células se sembraron a 2.000 células/pocillo en un cultivo en placa de 6 pocillos.

*Formación de esferoides y diferenciación adiposa*

Se cultivaron CMCUh en medio DMEM/F12 (vol/vol) (Invitrogen), 1 % de B27 (Invitrogen), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), 100 UI/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina en una placa de 60 mm, y 5-7 días después se fotografiaron los esferoides. Para inducir la diferenciación adiposa las CMCUh se cultivaron en un medio adipogénico Bulletkit de diferenciación CMMh (Lonza Biologicals, Walkersville, EE.UU.) en placas de 60 mm durante 12 días, y luego se fijaron en formaldehído para la tinción con Oil Red O (Sigma).

*Producción de medio acondicionado*

Se sembraron células a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en DMEM:medio F12 con 10 % de FBS y antibióticos. Después de 48 horas, las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se cultivaron en DMEM:F12 sin FBS durante 24 horas o 48 horas. Entonces, el medio se recogió como medio acondicionado (MA), se centrifugó 10 minutos a 300 g y se usó inmediatamente o se conservó a -20 °C.

**II - Resultados**

Se examinaron células madre de cuello uterino humano (CMCUh) obtenidas de la exfoliación del cuello uterino para el fenotipo inmunitario usando inmunocitoquímica y citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 1A, las CMCUh se inmunomarcán positivamente con  $\beta$ -catenina, y anticuerpos contra vimentina, y algunas células focales difusas también son positivas para los anticuerpo pan-citoqueratina. Además, las CMCUh tienen una fuerte expresión de tres factores de transcripción característicos de células madre embrionarias, es decir, OCT4, KLF4 y Sox2 (Figura 1B). El fenotipo de las CMCUh también se determinó por citometría de flujo. Los presentes inventores encontraron que estas células eran positivas para CD29, CD44, CD73 y CD90, mientras que eran negativas para CD34, CD45, CD133 (marcadores hematopoyéticos), CD117, CD31, TRA-1-81 (marcador de superficie de células madre embrionarias) y HLA-DR (Figura 1C).

Para evaluar adicionalmente las características de las células CMCUh, fueron inducidas a formar esferoides. Después de siete días en cultivo, las células individuales se mantuvieron en cultivo en suspensión en un medio acondicionado libre de suero. Después de siete días, las células formaron estructuras esferoides clonales (Figura 1D).

Por tanto, la tasa de proliferación de las CMCUh se determinó contando el número total de células en pocillos duplicados cada día durante 12 días. Las CMCUh proliferan a una velocidad de 0,4-2,1 duplicaciones cada 24 horas (Figura 2).

**Ejemplo 2: Experimentos relacionados con la inflamación****I - Material y métodos**

*Ensayo de inmunogenicidad*

Se usó el ensayo de la reacción de linfocitos mixta (MLR) unilateral para determinar la inmunogenicidad de las células madre de cuello uterino humano (CMCUh). La MLR se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos usando medio RPMI 1640 sin FBS. Se sembraron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) derivadas de dos donantes diferentes a  $2 \times 10^5$  células por donante por pocillo. Se usaron diferentes donantes para maximizar la probabilidad de que al menos una de las CMSP fuera una discordancia importante con las células de prueba CMCUh. Las células estimuladoras usadas en el ensayo incluyeron CMSP autólogas (respuesta basal), CMSP alógenas (respuesta de control positivo) y la población de células CMCUh. Las células estimuladoras fueron mitomicina C tratada antes de ser añadida a los pocillos de cultivo ( $2 \times 10^4$  células por pocillo, 10 % de células estimuladoras). Los cultivos de controles adicionales consistieron en CMSP sembradas en medio solo (sin células estimuladoras), CMSP estimuladas con concanavalina A (Con A) y CMCUh tratadas solo con mitomicina C. Se realizaron cultivos por triplicado para cada tratamiento. La proliferación se evaluó mediante reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche applied bioscience). Las células vivas (metabólicamente activas) redujeron las sales de tetrazolio a compuestos de formazano coloreados; las células muertas no. Así, los ensayos colorimétricos basados en sales de tetrazolio detectaron exclusivamente células viables. La absorbancia de las muestras se midió con un control de fondo como blanco usando un lector de placas de microtitulación. La longitud de onda para medir la absorbancia del producto de formazano está de entre 420-480 nm (absorción máx. a aproximadamente 440 nm). La longitud de onda de referencia debe ser superior a 600 nm.

**Inhibición de la diferenciación monocítica**

Para esta prueba se usó la línea celular U937. Se sembraron células en una placa de 24 pocillos a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células/pocillo en DMEM:F12 con un 10 % de FBS y antibióticos. Se añadieron 2 ng/ml de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA), el tratamiento con PMA, que activa la proteína cinasa C, induce un mayor grado de diferenciación en las células U937 como se refleja por un aumento de la adherencia y la expresión de los marcadores de superficie asociados a la diferenciación de macrófagos. En los pocillos de control no se añadió solución de PMA. Después de 24 horas, el medio se cambió por medio acondicionado de CMCUh o de células madre humanas derivadas de tejido adiposo (CEA, StemPro®, Invitrogen), en los pocillos de prueba durante otras 24 horas. La prueba adicional consistió en la línea celular U937 estimulada con PMA en presencia de medio acondicionado. Se recogió el sobrenadante y las células adherentes se lavaron, se tripsinizaron y se recogieron en el tubo correspondiente. Las células se centrifugaron 5 min a 200 g y se resuspendieron en 100 µl de PBS. La diferenciación a macrófagos se monitorizó mediante la expresión del marcador de diferenciación de monocitos CD11b mediante análisis por citometría de flujo. Las células se tiñeron con el anticuerpo monoclonal PE-CD11b y con 7-AAD para evaluar la viabilidad celular. El antígeno Mac-1 (CD11b) fue originalmente descrito como un marcador de superficie celular para los macrófagos. El antígeno Mac-1 media en la unión y fagocitosis de partículas recubiertas con C3b1 por granulocitos y macrófagos. Además, parece que Mac-1 media en una amplia variedad de funciones dependientes de adhesión, que incluyen quimiotaxia de granulocitos, adhesión a superficies y agregación.

**Inhibición de la proliferación de CMSP con medio acondicionado**

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de voluntarios sanos de 20 ml de sangre periférica heparinizada por centrifugación en gradiente de densidad Histopaque-1077 (Sigma). Las células recuperadas de la interfase se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en RPMI 1640 complementado. La viabilidad de las CMSP se determinó por exclusión de azul de tripano. Se congelaron alícuotas de las CMSP aisladas y se almacenaron a  $-80^\circ$  hasta su uso posterior. Para los experimentos, las alícuotas congeladas de las CMSP fueron elegidas al azar de los 8 donantes no emparentados, se descongelaron y se usaron.

Para ensayar la proliferación de CMSP, se cultivaron CMSP aisladas ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) durante 4 días en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en DMEM:F12 sin FBS, con medio acondicionado (de CMCUh o CEA) y se estimularon con 1 µg/ml de concanavalina A (Con A). CMSP solas y CMSP estimuladas con Con A con dexametasona  $10^{-6}$  M sirvieron como control de la proliferación basal y control de la inhibición, respectivamente. La proliferación se evaluó mediante el reactivo de proliferación celular WST-1. Este ensayo detecta exclusivamente células viables. La absorbancia de las muestras se midió contra un control de fondo como blanco usando un lector de placas de microtitulación.

**II - Resultados**

Se realizaron ensayos de MLR unilaterales para evaluar la inmunogenicidad de las CMCUh. Se midió la proliferación de CMSP basándose en el aumento del número de células vivas metabólicamente activas en presencia de células estimuladoras tratadas con mitomicina C. Las CMSP autólogas y alógenas sirvieron de controles de células estimuladoras negativas y positivas, respectivamente. Las CMSP estimuladas con ConA sirvieron de otras células de control de la estimulación positivas. Como se muestra en la Figura 3, las CMCUh no indujeron la proliferación de linfocitos T en ensayos de MLR.

Además, la diferenciación a macrófagos se monitorizó por la expresión del marcador de diferenciación de los monocitos CD11b mediante análisis por citometría de flujo. En la Figura 4, se mostró la inhibición de la diferenciación monocítica con la estimulación en presencia de medio acondicionado de CMCUh. El nivel basal de la expresión de CD11b de U937 fue del 34 % y en comparación con las células U937 de control tratadas con PMA, el porcentaje de células teñidas positivas para CD11b disminuyó del 73 % en células U937 tratadas con PMA al 48 % en células U937 tratadas con medio acondicionado de CMCUh. El porcentaje de expresión de CD11b para las células U937 tratadas con medio acondicionado CEA fue del 67 %. Vale la pena señalar que la viabilidad de las células U937, en todas las condiciones, fue superior al 80 %. Estos datos indican una inhibición o protección de la diferenciación de monocitos en presencia de medio acondicionado de CMCUh. En la Figura 5, se muestra la inhibición de la diferenciación monocítica: estimulación durante 24 horas y adición de medio acondicionado de CMCUh. El nivel basal de la expresión de CD11b de U937 fue del 38 % y en comparación con las células U937 de control tratadas con PMA, el porcentaje de células teñidas positivas para CD11b disminuyó del 82 % en células U937 tratadas con PMA al 48 % en células U937 tratadas con medio acondicionado de CMCUh producido durante 24 horas (MA 24 horas), y al 34 % en las células U937 tratadas con medio acondicionado producido durante 48 horas (MA 48 horas). Sin embargo, la expresión de CD11b en células U937 tratadas con CEA MA 48 horas fue del 77 %. Vale la pena señalar que la viabilidad de las células U937, en todas las condiciones, fue superior al 80 %. Estos datos indican una inhibición de la diferenciación de monocitos en presencia de medio acondicionado de CMCUh y en el caso de medio acondicionado 48 horas el porcentaje de células CD11b positivas fue sensiblemente el mismo que el del nivel basal de U937.

En la Figura 6, se muestra la inhibición de la proliferación de CMSP con medio acondicionado. Tanto los medios acondicionados de CMCUh durante 24 horas como 48 horas suprimieron la proliferación de CMSP. La supresión fue más eficaz con el medio acondicionado de CMCUh que con el medio acondicionado de CEA. La magnitud de supresión por el medio acondicionado de CMCUh superó a la de la dexametasona. La dexametasona es el fármaco antiinflamatorio más potente, estos datos sugieren el alto potencial antiinflamatorio del medio acondicionado de CMCUh.

### Ejemplo 3: Experimentos relacionados con el cáncer

#### I - Materiales y métodos

##### *Cultivos celulares*

Se obtuvieron células MCF-7 y MDA-MB-231 (líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano) de la Colección Europea de Cultivos Celulares (Salisbury, Wilts, RU) y se obtuvieron HT29 (línea celular de adenocarcinoma colorrectal) y AGS (línea celular de adenocarcinoma gástrico) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). Estas líneas celulares se cultivaron en placas de Petri de 90 mm en DMEM complementado con 10 % de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina en una atmósfera aire-CO<sub>2</sub> (95:5) a 37 °C. Las células confluentes se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato y se recogieron mediante una breve incubación con solución de tripsina- EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en PBS. Se cultivaron células madre del cuello uterino humano (CMCUh, obtenidas como se ha descrito anteriormente), los cultivos primarios de tumores de mama humanos y las células madre derivadas de tejido adiposo humano (CEA, StemPro®, Invitrogen) en placas de Petri de 90 mm en DMEM-F12 (1:1) complementado con 10 % de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina en una atmósfera de aire-CO<sub>2</sub> (95:5) a 37 °C.

Se obtuvo medio acondicionado (MA) de CMCUh, CEA, MCF-7 y MDA-MB-231 cultivando las células al 70 % de confluencia en DMEM-F12 (10 % de FBS). Entonces, las células se lavaron tres veces en PBS, y se cultivaron de nuevo en DMEM- F12 sin FBS. Después de 24 o 48 horas, el medio se centrifugó durante 10 minutos a 300 g, el sobrenadante se recogió y se usó inmediatamente.

Se realizó un cultivo celular tridimensional. Brevemente, se recubrieron portaobjetos de cultivo con 60 µl de Matrigel helado (BD Biosciences) y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos para permitir que el Matrigel solidificara. Las células se trataron durante 5 minutos con una solución al 0,25 % de tripsina-EDTA (2,5 g/l de tripsina, 0,38 g/l de EDTA) (Invitrogen). Se colocó con cuidado una suspensión de una sola célula que contenía  $5 \times 10^3$  células por 100 µl de volumen de medio, complementado con 2 % (vol/vol) de Matrigel, en la parte superior del Matrigel solidificado. La incubación se llevó a cabo a 37 °C durante 30 minutos para permitir que las células se unieran al Matrigel. Los portaobjetos de cultivo se colocaron en placas de seis pocillos, se añadieron 500 µl de medio por pocillo, y las células se cultivaron durante 10 días. Las CMCUh se trataron entonces con diferentes medios (DMEM-F12 con 10 % de FBS (+FBS), DMEM-F12 sin FBS (-FBS), o medio acondicionado durante 48 horas de CMCUh) durante 1 semana. Se tomaron fotografías de contraste de fase de células como monocapas, o en cultivos tridimensionales, con una cámara Olympus DP72. La cuantificación del diámetro de la esfera se realizó manualmente mediante el trazado de una línea recta a través del diámetro de la esfera y anotando su valor como unidades de longitud arbitraria.

*Co-cultivos*

Se cultivaron células como se ha descrito anteriormente. El medio se eliminó al 70 % de confluencia y las células se marcaron con solución CellTracker™ pre-calentada (MCF-7 y MDA-MB-231 con CellTracker™ GREEN CMFDA, y CMCUh con CellTracker™ RED-CMPTX; Invitrogen, Eugene, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Entonces se sembraron  $1 \times 10^5$  células MCF-7 o MDA-MB-231/ pocillo en placas de 6 pocillos, y cuatro horas después se añadieron  $1 \times 10^5$  células CMCUh a las células MCF-7 o MDA-MB-231 y se co-cultivaron durante 72 horas. Las imágenes se fotografiaron al azar a las 12, 48 y 72 horas con una cámara digital de alta resolución (Olympus DP 72; Olympus Corp., Tokio, Japón). Se superpuso un marco de recuento ( $102 \mu\text{m}^2$ ) a la imagen capturada, y solo se contaron las células claramente visibles en al menos tres campos diferentes en las microfotografías, usando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.).

*Proliferación de la línea celular de adenocarcinoma colorrectal y gástrico*

Se evaluó la proliferación de HT29 y AGS usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche). Las líneas celulares HT29 y AGS se sembraron a  $2 \times 10^4$  células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. Veinticuatro horas después, las células se trataron con volúmenes iguales (150  $\mu\text{l}$ ) de DMEM-F12 con 10 % de FBS (control), DMEM-F12 sin FBS (sin FBS) y medio acondicionado 24 o 48 horas a partir de CMCUh, CEA durante 24 o 48 horas. El reactivo WST-1 (15  $\mu\text{l}$ ) se añadió a cada pocillo, y la mezcla se incubó durante 1 hora. La absorbancia (440 nm) se midió frente a un control de fondo como blanco usando un lector de placas de microtitulación.

*Metabolización MTT*

Se llevaron a cabo experimentos de viabilidad/proliferación celular usando ensayos de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se sembraron MCF-7, MDA-MB-231 o cultivos primarios de tumores de mama humanos a  $3 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 24 pocillos. Veinticuatro horas después, las células se trataron con volúmenes iguales (500  $\mu\text{l}$ ) de DMEM-F12 con 10 % de FBS (+FBS), DMEM-F12 sin FBS (-FBS) y medio acondicionado 24 o 48 horas de MCF- 7, MDA-MB-231, CMCUh, CEA o cultivos primarios de tumores de cáncer de mama durante 24 o 48 horas. Se añadió MTT (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) a cada pocillo, y la mezcla se incubó durante 1 hora. Después se eliminó el medio, y se añadió DMSO (500  $\mu\text{l}$ ) a cada pocillo. La absorbancia de las muestras se midió a 570 nm en un lector de placas de múltiples pocillos (Tecan ULTRA Evolution, Männedorf, Suiza). Los resultados se representaron como valores medios  $\pm$  valores de DE del cuadruplicados de al menos dos experimentos independientes.

*Análisis de transferencia Western*

Se lisaron células MCF-7, MDA-MB-231 y cultivos primarios de tumores de mama humanos a 4 °C en 300  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; EGTA 5 mM;  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM; 1 % de SDS; 10 % de glicerol; 1 % de Triton X-100; ortovanadato de sodio 10 mM; PMSF 4 mM y aprotina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). El lisado celular se centrifugó entonces a 14.000 x g durante 5 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante resultante, y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford. Se llevó a cabo análisis de transferencia Western. Brevemente, se sometieron 60  $\mu\text{g}$  de proteína total a electroforesis en SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloquearon y se inmunomarcaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo primario (véase la Tabla 1), se lavaron tres veces con PBS-Tween-20 y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado durante 1 hora. La señal se detectó con el sustrato de transferencia Western Pierce ECL (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.), y se visualizó mediante la colocación de la transferencia en contacto con película de rayos X estándar, según las instrucciones del fabricante.

**TABLA 1:** Anticuerpos primarios

Antígeno	Fuente	Aplicación
Desmina	Dako	ICC
CK (clon AE1/AE3)	Dako	ICC
Actina HHF35	Dako	ICC
Caspasa-3 activa (asp175)	Cell Signaling	IHC, WB
p63	Dako	ICC
Ciclina D1 (clon 7213G)	Santa Cruz Biotech	WB
Actina de músculo liso	Dako	ICC
E-cadherina (clon NCH-38)	Dako	ICC
KLF4 (clon B-9)	Santa Cruz Biotech	ICC
OCT4 (clon 7F9,2)	Millipore	ICC
PARP escindida	Cell Signaling	WB

Antígeno	Fuente	Aplicación
Sox2 (clon SOX2-6)	Sigma-Aldrich	ICC
Ciclina A	BD Biosciences	WB
Ciclina B	Santa Cruz Biotech	WB
Ciclina E	Santa Cruz Biotech	WB
$\beta$ -catenina (clon 1)	Dako	ICC
Vimentina (clon V9)	Dako	ICC
GAPDH	Santa Cruz Biotech	WB
Caspasa 8 (D391)	Cell Signaling	WB
Caspasa 9 (clon C9)	Cell Signaling	WB
Caspasa 12	Cell Signaling	WB
Bim (clon C34C5)	Cell Signaling	WB
Bid	Cell Signaling	WB
ICC: inmunocitoquímica; IHC: inmunohistoquímica; WB: Transferencia Western		

#### Ensayos de ciclo celular y de apoptosis

Se llevaron a cabo ensayos de ciclo celular y de apoptosis usando un citómetro de flujo Guava (Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU.). Brevemente, se cultivaron  $2 \times 10^5$  células/pocillo en: a) DMEM-F12 (1:1) complementado con 10 % de FBS, b) DMEM-F12 (1:1) sin FBS, y c) medio acondicionado, durante 48 horas, se recogieron, se fijaron con etanol frío al 70 % durante 30 minutos, se lavaron con PBS y se incubaron con ribonucleasa (100  $\mu$ g/ml), y yoduro de propidio (PI, 50  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos en la oscuridad, para la evaluación del ciclo celular. Se realizaron análisis de apoptosis usando anexina V-FITC. Las células se recogieron, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en un tampón de unión 1X (Hepes 0,1 M (pH 7,4), NaCl 1,4 M y  $\text{CaCl}_2$  25 mM). Se añadieron 5  $\mu$ l de FITC-anexina V y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, se añadieron 400  $\mu$ l de tampón de unión 1X a cada tubo, y se analizaron. La anexina V positiva y el PI negativo indican apoptosis temprana, mientras que tanto la anexina V negativa como el PI positivo indican apoptosis tardía.

#### Ensayo de invasión celular

Se realizaron ensayos en cámaras de invasión BD BioCoatMatrigel según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). Se usaron filtros previamente recubiertos con Matrigel para examinar la invasión celular. Las células MDA-MB-231 se colocaron en la cámara superior en 0,5 ml de medio libre de suero DMEM ( $5 \times 10^4$  células por filtro). El medio acondicionado de CMCUh de 48 horas de cultivo se colocó en la cámara inferior como 20 % de FBS. Después de la incubación durante 22 horas, las células que habían migrado a la superficie inferior de los filtros se fijaron en metanol durante 2 minutos a temperatura ambiente, se tiñeron usando cristal violeta durante 2 minutos, se visualizaron y se contaron. Los valores para la migración o invasión celular se expresaron como el número medio de células por campo microscópico en cuatro campos por un filtro para experimentos duplicados. Los experimentos se repitieron tres veces.

#### Estudios en animales

Todos los estudios en animales fueron autorizados por el Comité ético para experimentos en animales de la Universidad de Santiago de Compostela. Se usaron ratones hembra de la misma edad entre 6-8 semanas de edad, homocigóticos para la mutación espontánea de inmunodeficiencia grave combinada (CB17-Prkdc<sup>scid</sup>, llamada SCID, Parc Recerca Biomedica, Barcelona, España) para estudios de xenoinjerto. Se inyectaron trece ratones SCID (6 controles y 7 tratados) por vía subcutánea con  $3 \times 10^6$  células MDA-MB-231 transfectadas de forma estable con el vector pcDNA3-luciferasa (células MDA-MB-231-luc) en el flanco izquierdo y derecho. Quince días después de la inyección de células, los ratones se inyectaron por vía intratumoral (150  $\mu$ l) con medio acondicionado (MA) 48 horas de CMCUh o con placebo cada cinco días hasta el día cuarenta y siete. Después de la inyección de luciferina (150 mg/kg), se monitorizó externamente el crecimiento del tumor por luminiscencia usando In Vivo Imaging System (IVIS, Caliper Life Sciences, Alameda, CA, EE.UU.). Se obtuvo un mapa de intensidad utilizando el software Living Imagen (Caliper Life Sciences). El software usa una escala basada en color para representar la intensidad de cada píxel (que oscilan desde azul, que representa bajo, al rojo, que representa alto). Se sacrificaron un ratón de control y un ratón tratado con MA en el día 31, y se les extirparon los tumores, se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % durante 24 horas y se incorporaron en parafina para estudios histológicos e inmunohistoquímicos. Todos los ratones restantes se monitorizaron para los análisis de supervivencia.

*Inmunohistoquímica*

Se fijaron por inmersión tumores de ratón en formalina tamponada neutra al 10 % durante 24 horas y se incorporaron en parafina rutinariamente. Se montaron secciones de 4 µm de espesor en portaobjetos de microscopio Flex IHC (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se realizó automáticamente la técnica inmunohistoquímica (IHC) en un AutostainerLink 48 (Dako). Se empleó un anticuerpo de caspasa 3 activado (Cell Signaling). La recuperación del epítipo se realizó en un horno de microondas 20 minutos utilizando una solución de recuperación de diana EnVision FLEX (pH 9). Todos los anticuerpos se incubaron durante 20 minutos a TA. Como sistema de detección los presentes inventores usaron EnVision FLEX/HRP Dako (polímero de dextrano conjugado con peroxidasa de rábano picante e inmunoglobulinas anti-ratón y anti-conejo de cabra aisladas por afinidad) durante 20 minutos.

**II - Resultados***Efecto de las CMCUh sobre la proliferación de células cancerosas humanas*

Para explorar el posible efecto de las CMCUh sobre la línea de células cancerosas, se evaluó el ensayo de proliferación celular en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal (HT29) y gástrico (AGS) tratada durante 48 horas con medio completo (control), medio incompleto (sin FBS), medio acondicionado de CMCUh producido durante 24 horas o 48 horas y medio acondicionado de CEA producido durante 48 horas. El efecto del medio acondicionado de CMCUh sobre la proliferación de células de adenocarcinoma colorrectal y gástrico fue más potente que el medio acondicionado de CEA (Figura 7A).

Para explorar el posible efecto de las CMCUh sobre cáncer de mama después de la administración de medio acondicionado (MA) de CMCUh, se evaluaron la proliferación/citotoxicidad en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 no invasivo y en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 altamente invasivo. Como se muestra en la Figura 7B-C, después de 24 y 48 horas de la administración de MA de CMCUh (de 24 o 48 horas) a células MCF-7, no se observó disminución significativa de la metabolización de MTT, en comparación con las células tratadas con medio sin FBS o MA producido a las 24 o 48 horas por células MCF-7. Sin embargo, cuando se administra el mismo MA de CMCUh a la línea celular MDA-MB-231, se observa una disminución significativa en la proliferación celular a las 24 horas (MA de CMCUh cultivadas durante 48 horas,  $P < 0,01$ ) y 48 horas (MA de CMCUh cultivadas durante 24 y 48 horas,  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ , respectivamente) (Figura 7D-E). Para evaluar si el efecto del MA de CMCUh sobre la proliferación celular podría mantenerse por co-cultivo de CMCUh con células MCF-7 o MDA-MB-231 o si solo depende del MA, las células MCF-7 y MDA-MB-231 se marcaron con un colorante verde, y las CMCUh se marcaron con un colorante rojo. Se encontró que mientras que las células MCF-7 co-cultivadas con CMCUh crecían igual que las MCF-7 cultivadas solas (Figura 7F), el co-cultivo de las células MDA-MB-231 con CMCUh reducía significativamente ( $P < 0,01$ ) el número de células MDA-MB-231, en comparación con el crecimiento de las células MDA-MB-231 solas (Figura 7G).

*El medio acondicionado de CMCUh retrasa el ciclo celular e induce la apoptosis en la línea celular MDA-MB-231*

Dado que el MA de CMCUh disminuyó significativamente la proliferación de células MDA-MB-231, se evaluaron el ciclo celular y la apoptosis como posibles mediadores de esta disminución. Las células MDA-MB-231 se cultivaron durante 48 horas con DMEM más 10 % de FBS (+FBS), DMEM sin FBS (-FBS), o MA de 48 horas de CMCUh, y entonces los presentes inventores realizaron citometría de flujo usando yoduro de propidio (PI) (para evaluar el ciclo celular) y anexina V/PI para evaluar la apoptosis. Además, se llevaron a cabo transferencias Western para evaluar la expresión de las proteínas implicadas tanto en el ciclo celular como en la apoptosis. Los resultados indican que las células tratadas con MA aumentan significativamente la fase G0-G1 en relación con las células tratadas con medio completo (+FBS) o incompleto (-FBS) (Figura 8A). Por lo tanto, se observó una disminución visible en la expresión de la proteína ciclina A, ciclina B y ciclina D1 en células tratadas con MA (Figura 8B). El tratamiento de las células MDA-MB-231 con MA indujo un aumento significativo de las células anexina+/PI-, y anexina+/PI+ frente a las células cultivadas sin FBS, sugiriendo que el MA induce apoptosis temprana y tardía, respectivamente (Figura 8C). Las inmunotransferencias de extractos de proteínas de las células MDA-MB-231 tratadas con MA mostraron un claro aumento en la caspasa-8, -12, -9, caspasa-3 activada y PARP escindida (Figura 8D), y una disminución de Bid y Bim (Figura 8E), con respecto a las células tratadas con medio completo (+FBS) e incompleto (-FBS).

*La invasión, la formación de cultivos 3-D, el crecimiento tumoral y la tasa de supervivencia se modifica por medio acondicionado de CMCUh*

Se exploró si el MA de CMCUh afectaba a la invasión de células MDA-MB-231 a través de una matriz de Matrigel. La Figura 9A muestra una disminución significativa ( $P < 0,001$ ) de la capacidad de invasión de células MDA-MB-231 en presencia de MA, en comparación con las células en presencia de medio incompleto (-FBS). También se exploró el crecimiento tridimensional de células MDA-MB-231. Para estos experimentos, se cultivaron células MDA-MB-231 en Matrigel, un medio semisólido en el que se forman estructuras esféricas. El tratamiento con el MA mostró una disminución sustancial en el diámetro de estas esferas, que no fue apreciable cuando las células se trataron con medio incompleto (MA, diámetro medio =  $2,8 \pm 1,0$  frente a -FBS, diámetro medio =  $5,7 \pm 1,6$ , unidades arbitrarias,  $P = 0,023$ ) (Figura 9B).

A continuación se evaluó el efecto de la administración intratumoral de MA *in vivo* usando el modelo de xenoinjerto de tumor de ratón inmunodeficiente grave (SCID). Los ratones se inyectaron con células MDA-MB-231 transfectadas de forma estable con el vector de la luciferasa en el panículo adiposo mamario y 15 días después, cuando el tumor se volvió visible, se inyectaron por vía intratumoral, cinco días cada uno, tanto con medio incompleto (controles) como con MA de CMCUh (150  $\mu$ l), y se monitorizaron externamente por luminiscencia (Figura 9C). Se observó una disminución significativa ( $P = 0,011$ ) en el volumen del tumor después de 15 días de tratamiento con MA (en el día 30) (Figura 9D). En el día 33, se sacrificaron dos animales (uno de los ratones de control y otro tratado con MA), se extirparon los tumores, y se analizaron por inmunohistoquímica para la caspasa-3 activada (como indicador de la apoptosis). La Figura 9E muestra un aumento significativo de la expresión de la caspasa-3 activada en ratones tratados con MA. Para evaluar la tasa de supervivencia de los ratones, se inyectaron los ratones restantes cada 5 días con tanto MA como con placebo, y se observaron hasta el día 47. Como se muestra en la Figura 9F, las gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier indican que los ratones tratados con MA tuvieron una supervivencia global mayor en comparación con los ratones de control ( $P = 0,019$ ).

#### 15 *El medio acondicionado reduce la proliferación en tumores con alta tasa de proliferación*

A continuación se evaluó el efecto de la administración de MA de CMCUh en cultivos primarios de pacientes con tumores de mama. Así, se evaluaron diez cultivos primarios de cáncer de mama para la proliferación celular usando un ensayo MTT. Mientras que en células tumorales de mama con tasa de proliferación baja (11B3186, 11B2445, 11B530, 11B545, 11B980 y 11B2127) la administración del MA de CMCUh no tuvo efecto significativo sobre la proliferación celular en comparación con el efecto producido por el medio incompleto (-FBS), el MA en sí mismo, o el MA producido por células del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA) en cultivos primarios de tumores de mama con mayor tasa de proliferación (11B512, 11B3285, 11B3171 y 11B7352), la administración de MA de CMCUh indujo una disminución significativa ( $P < 0,001$ ) en la proliferación celular en comparación con otros tratamientos (Figura 10A). También se evaluó la expresión de ciclina D1 y de PARP escindida en extractos de proteínas de estos tumores primarios con mayor tasa de proliferación. Los resultados se muestran en la Figura 10B. Se observó una clara disminución en la expresión de la ciclina D1 y la escisión de PARP cuando se administró MA de CMCUh, pero no en cultivos primarios tratados con medio incompleto (sin FBS).

#### 30 **Ejemplo 4: Inhibición del crecimiento de microorganismo patógeno por medio acondicionado de CMCUh**

##### I - Material y métodos

Las cepas bacterianas usadas fueron: *E. coli* (ATCC 25992), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299).

Se evaluó la inhibición del crecimiento de microorganismo patógeno en cultivos en placas de 96 micropocillos para determinar la dilución máxima de medio con actividad antimicrobiana. Brevemente, se colocaron 100  $\mu$ l de diluciones sucesivas 1:2 y 75  $\mu$ l de diluciones de control sucesivas 1:2 (medio DMEM-F12 sin FBS) y medio acondicionado (CMCUh o CMM derivadas de tejido adiposo) en placas de 96 pocillos. Entonces se añadió la suspensión bacteriana en el caldo de cerebro-corazón (dilución 1:300 de suspensión 0,5 McFarland) a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37° durante 24 a 48 h. La inhibición del crecimiento bacteriano se determinó comparando los pocillos de control con pocillos que contenían medio acondicionado de CMCUh o de CMM derivadas de tejido adiposo.

##### 45 II - Resultados

Todas las diluciones del medio de control mostraron un crecimiento bacteriano. El medio acondicionado de CMM derivadas de tejido adiposo no mostró actividad antimicrobiana, aunque el medio acondicionado de CMCUh mostró una inhibición del crecimiento bacteriano hasta 1/20 de dilución (Figura 11).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de aislamiento de células madre mesenquimatosas de cuello uterino no tumorales que comprende:
  - 5 (a) Preparar una suspensión de células de tejido de cuello uterino obtenido por exfoliación del cuello uterino,
  - (b) recuperar las células de dicha suspensión de células,
  - (c) incubar dichas células en un medio de cultivo celular adecuado y en condiciones que permitan que las células proliferen, y
  - 10 (d) seleccionar las células madre mesenquimatosas de cuello uterino no tumorales;

en el que las células madre mesenquimatosas de cuello uterino expresan los marcadores celulares CD29, CD44, CD73, CD105 y CD90, y no expresan CD117, CD133, HLA-DR, TRA1-81, CD45, CD34 y CD31.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende desagregar enzimáticamente el moco cervical.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que las células madre aisladas además:
  - (a) expresan los marcadores celulares vimentina, citoqueratina (CKAE1AE3), Klf4, Oct4 y Sox-2, y
  - 20 (b) no expresan al menos un marcador celular seleccionado del grupo que consiste en desmina, actina HHF35,  $\beta$ -catenina, p63 y E-cadherina.
4. Método según la reivindicación 3, en el que las células madre muestran además
  - 25 (a) una tasa de proliferación de 0,4 a 2,1 duplicaciones cada 24 horas en el medio de crecimiento,
  - (b) una morfología similar a fibroblastos,
  - (c) un cariotipo estable durante al menos 10 pases celulares,
  - (d) capacidad de crecer en monocapa y de adherirse a un sustrato,
  - (e) capacidad de diferenciarse en linaje celular endodérmico, ectodérmico o mesodérmico,
  - 30 (f) una capacidad no tumorigénica y/o
  - (g) capacidad de formar esferas.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tejido de cuello uterino es un tejido de cuello uterino de mamífero, preferentemente un tejido de cuello uterino humano.
- 35 6. Uso de tejido de cuello uterino aislado obtenido por exfoliación del cuello uterino para obtener células madre de cuello uterino mesenquimatosas no tumorales, en el que las células madre mesenquimatosas de cuello uterino expresan CD29, CD44, CD73, CD105 y CD90, y no expresan CD117, CD133, HLA-DR, TRA1-81, CD45, CD34 y CD31.
- 40 7. Una célula madre de cuello uterino mesenquimatosas no tumoral aislada obtenida por exfoliación del cuello uterino, en la que dicha célula:
  - (a) expresa los marcadores celulares CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, vimentina, citoqueratina (CKAE1AE3), Klf4, Oct4 y Sox-2, y
  - 45 (b) no expresa los marcadores celulares CD117, CD133, HLA-DR, TRA1-81, CD45, CD34 y CD31, preferentemente tampoco expresa al menos un marcador celular seleccionado del grupo que consiste en desmina, actina HHF35,  $\beta$ -catenina, p63 y E-cadherina.
- 50 8. Célula madre aislada según la reivindicación 7, en la que la célula muestra además
  - (a) una tasa de proliferación de 0,4 a 2,1 duplicaciones cada 24 horas en el medio de crecimiento,
  - (b) una morfología similar a fibroblastos,
  - (c) un cariotipo estable durante al menos 10, preferentemente 20 pases celulares,
  - (d) capacidad de crecer en monocapa y de adherirse a un sustrato,
  - 55 (e) capacidad de diferenciarse en un linaje celular adipogénico, osteogénico, neural o miocítico,
  - (f) una capacidad no tumorigénica y/o
  - (g) capacidad de formar esferas.
- 60 9. Célula madre aislada según la reivindicación 7 u 8, en la que la célula es de un mamífero, preferentemente de un ser humano, más preferentemente de una fase no menstrual humana.
10. Una población de células que comprende una célula madre aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 65 11. Un medio acondicionado obtenido por un método que comprende:

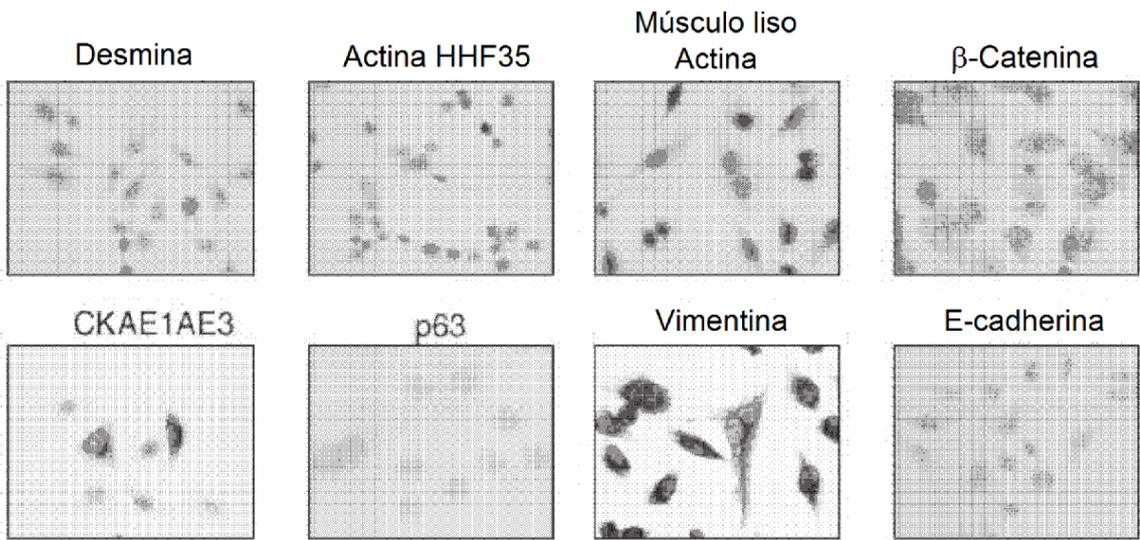
- (a) Incubar una célula madre aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 o una población de células según la reivindicación 10, y
- (b) eliminar las células del medio de cultivo.

- 5 12. Una composición farmacéutica que comprende una célula madre aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, una población de células según la reivindicación 10, o un medio acondicionado según la reivindicación 11, y un vehículo y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 10 13. Una célula madre aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, una población de células según la reivindicación 10, un medio acondicionado según la reivindicación 11 o una composición farmacéutica según la reivindicación 12 para su uso como un medicamento.
- 15 14. Una célula madre aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, una población de células según la reivindicación 10, un medio acondicionado según la reivindicación 11 o una composición farmacéutica según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, patologías crónicas o enfermedades infecciosas.
- 20 15. Una célula madre aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, una población de células según la reivindicación 10, un medio acondicionado según la reivindicación 11 o una composición farmacéutica según la reivindicación 12, para su uso según la reivindicación 14 inhibiendo o disminuyendo la proliferación y/o metástasis de células tumorales, la diferenciación monocítica, la proliferación de células mononucleares de sangre periférica o el crecimiento y/o la replicación de microorganismos patógenos, o potenciando o induciendo la apoptosis de células tumorales.

FIG.1

A

Fenotipo inmunitario



B

Marcadores de células madre

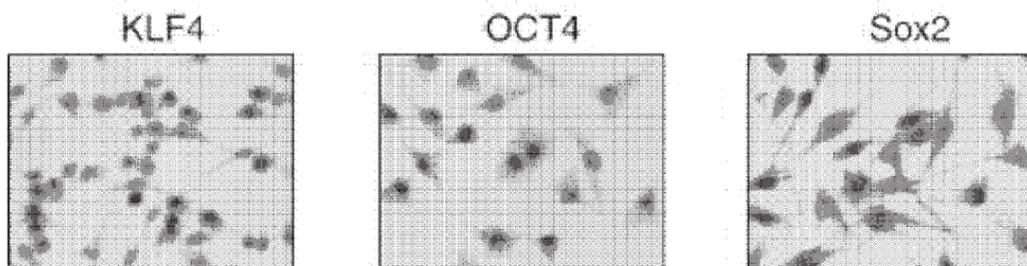


FIG. 1

C

**Análisis de citometría de flujo**

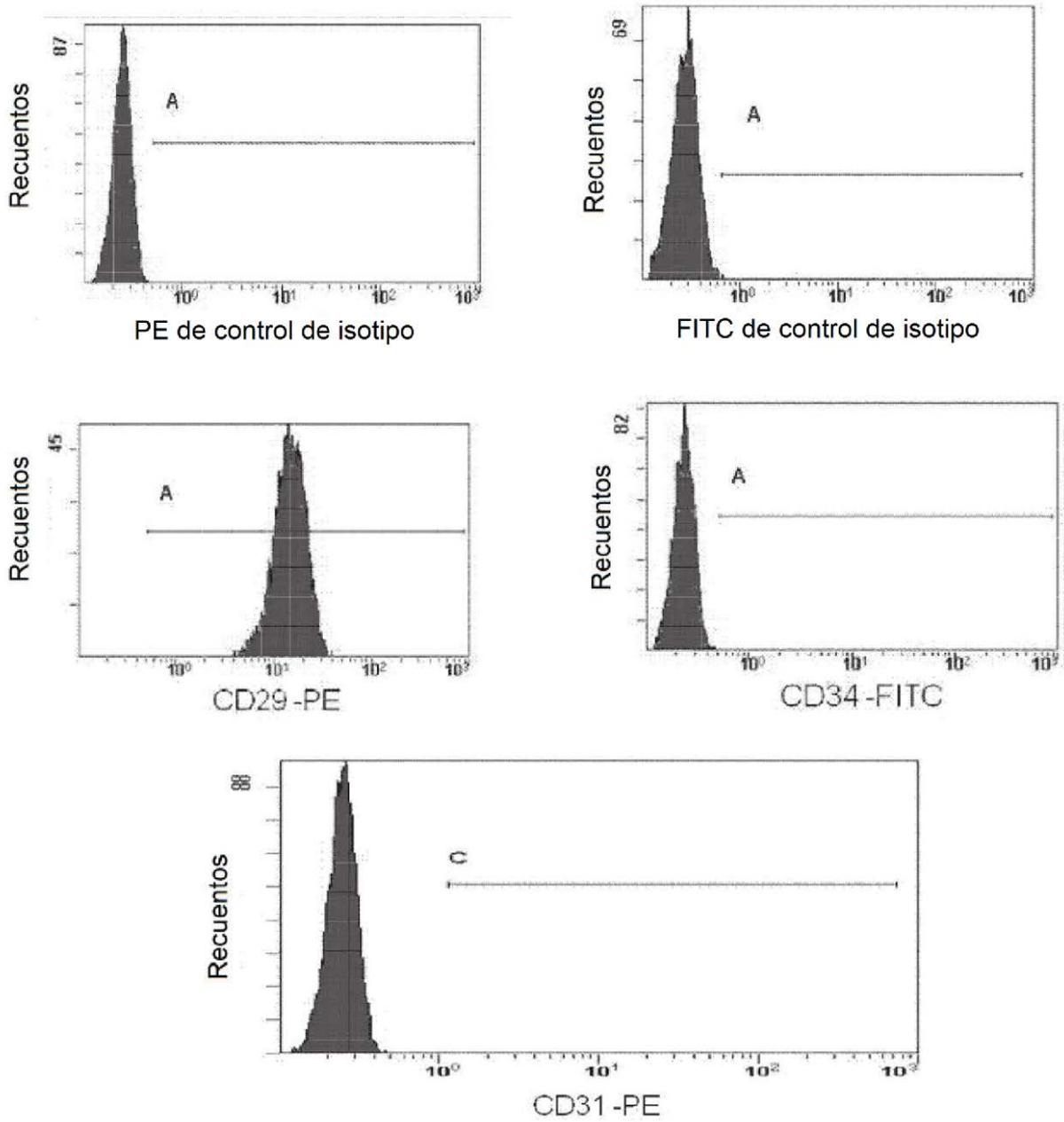


FIG.1

C

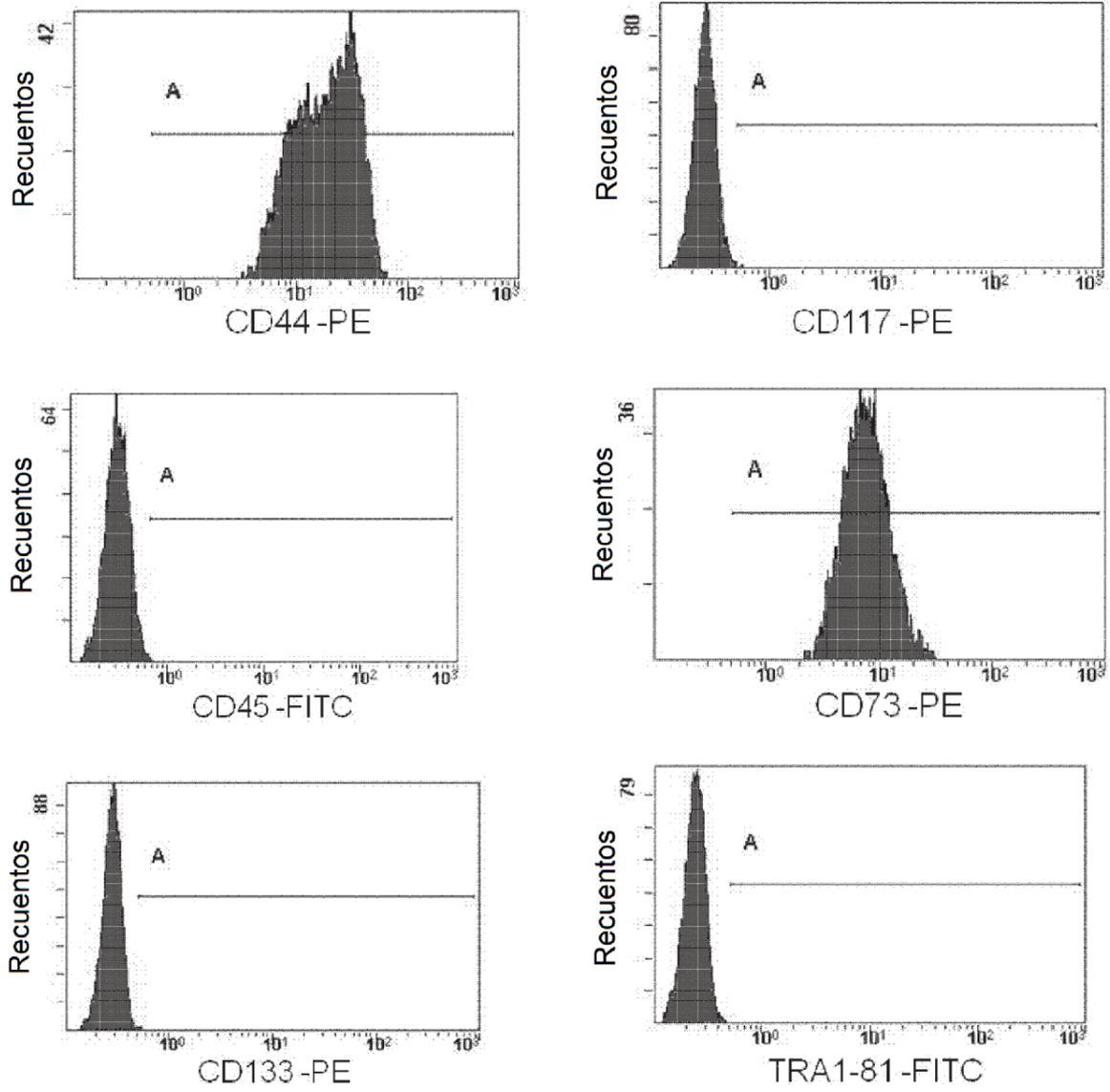
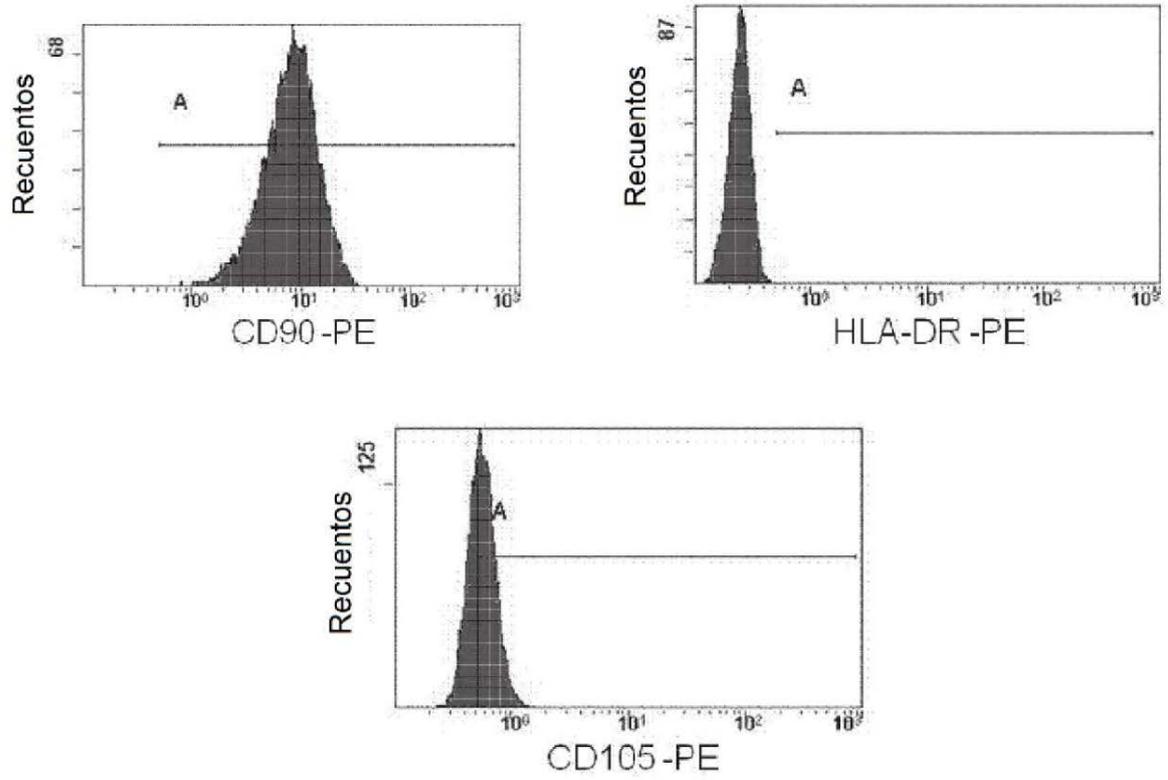


FIG. 1

C



D

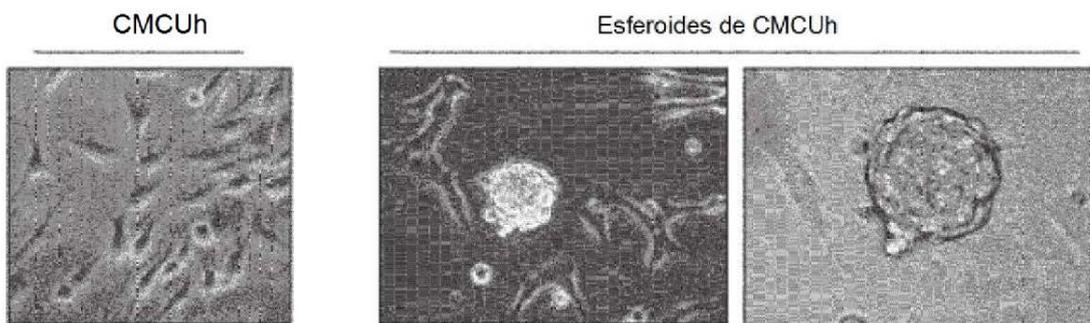


FIG.2

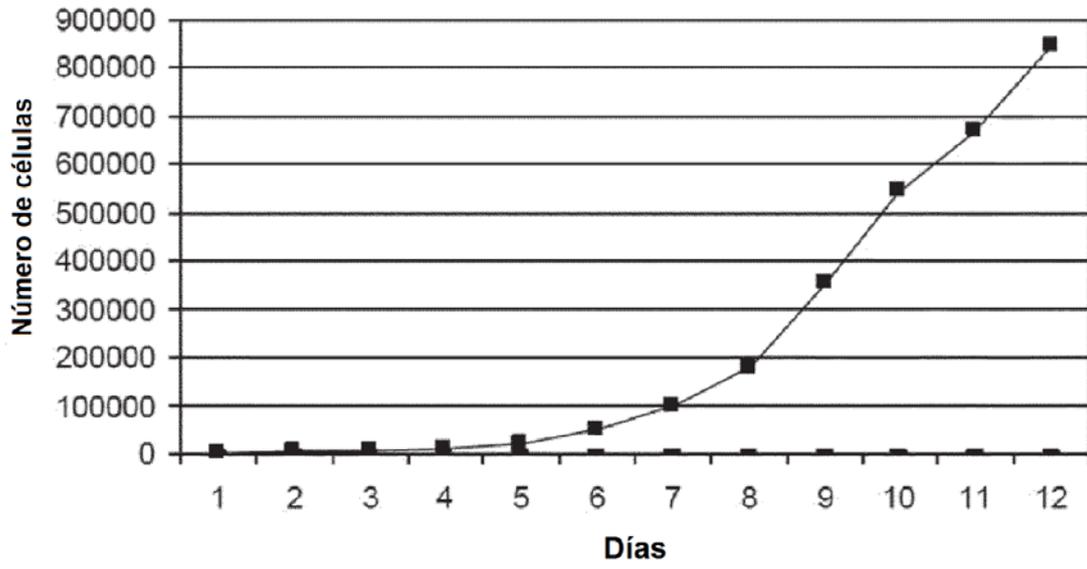


FIG. 3

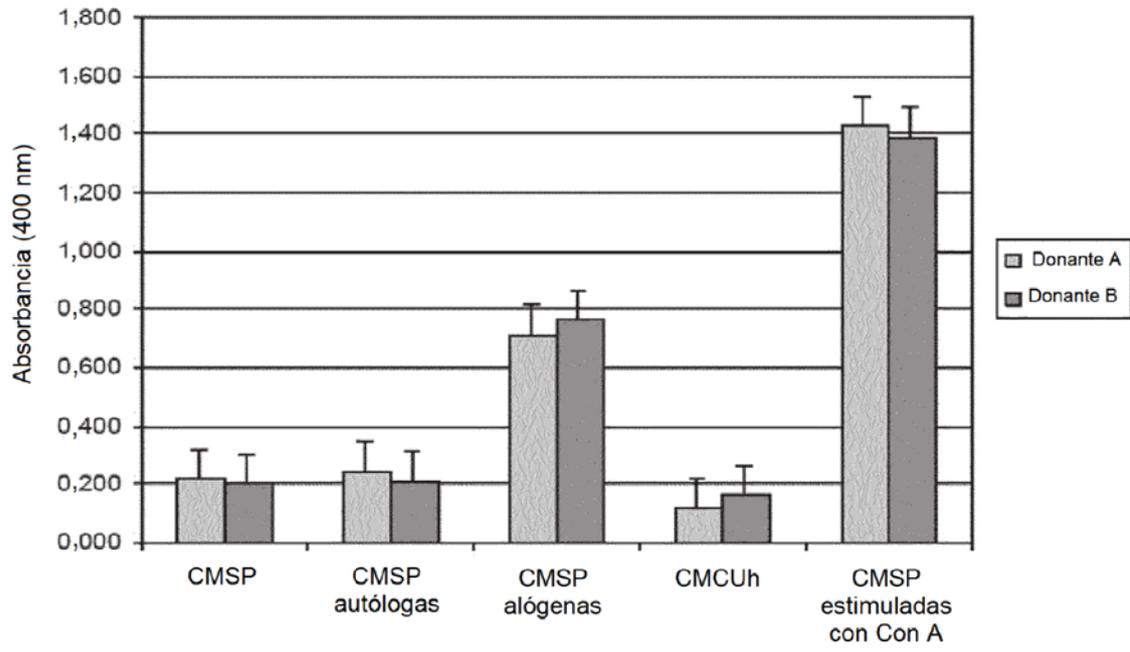
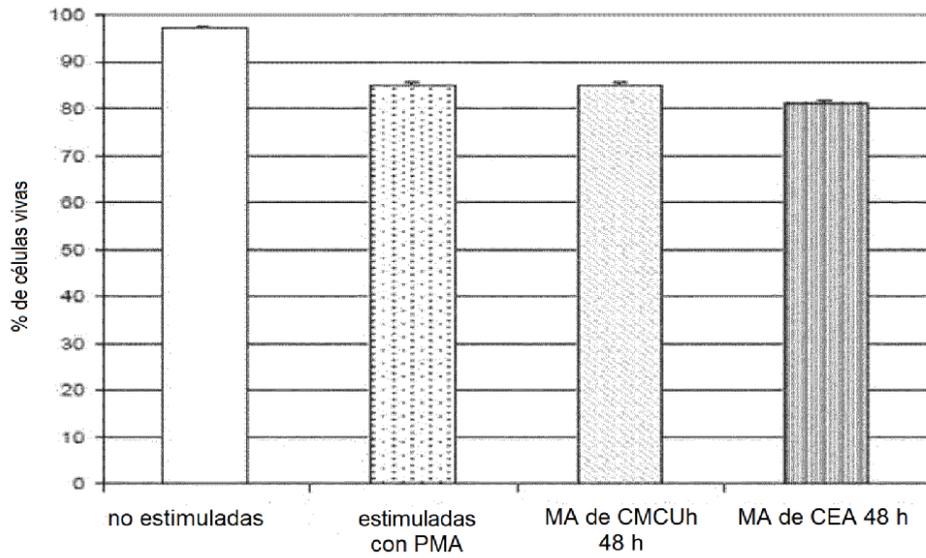


FIG. 4

**A**

**Viabilidad celular**



**B**

**Expresión de CD11b**

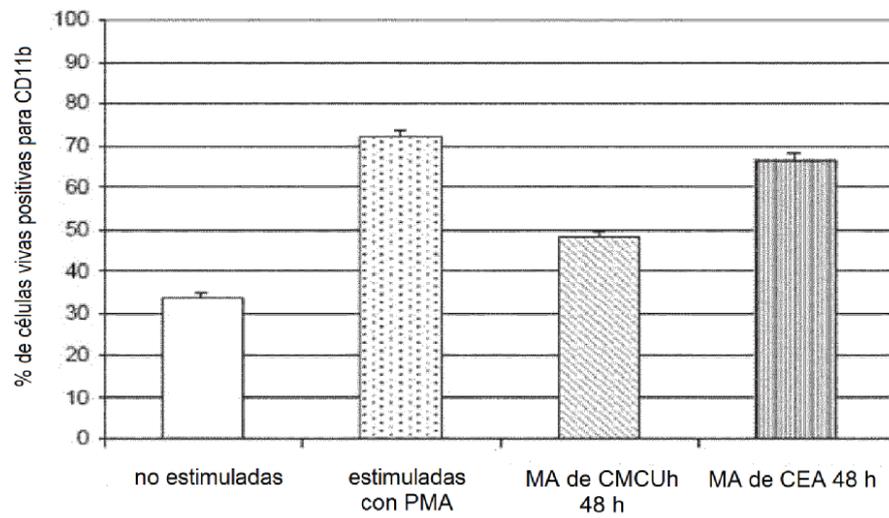
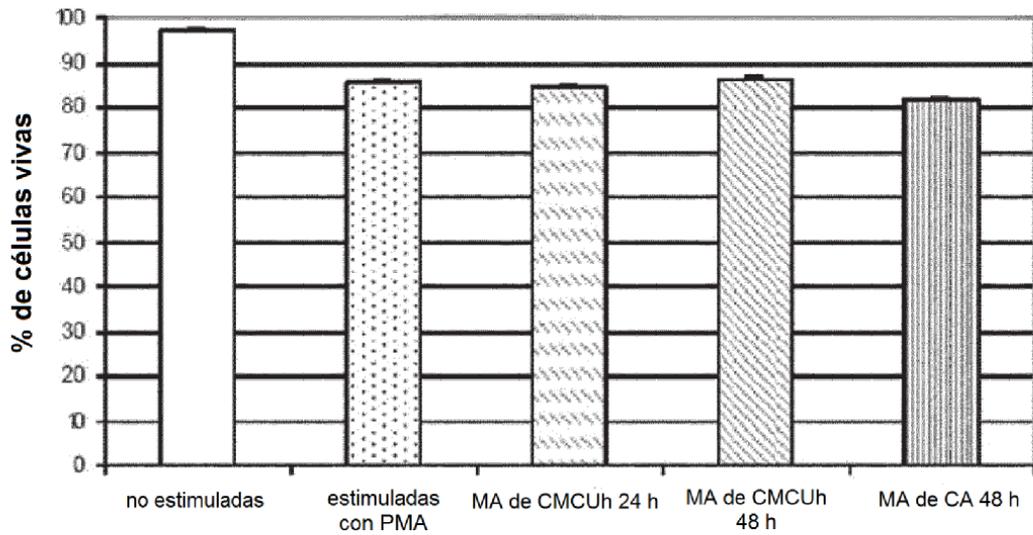


FIG. 5

**A**

Viabilidad celular



**B**

Expresión de CD11b

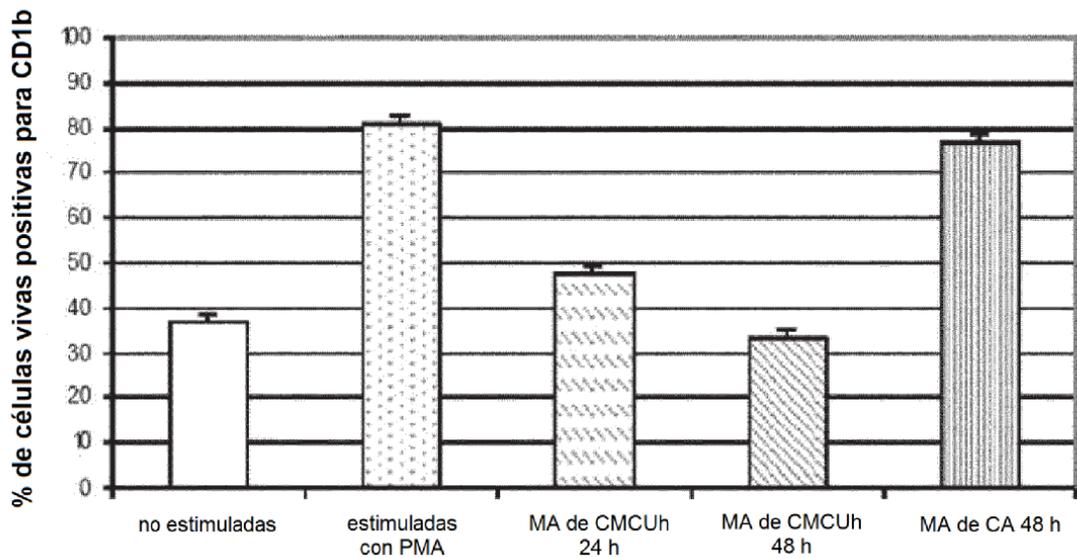


FIG. 6

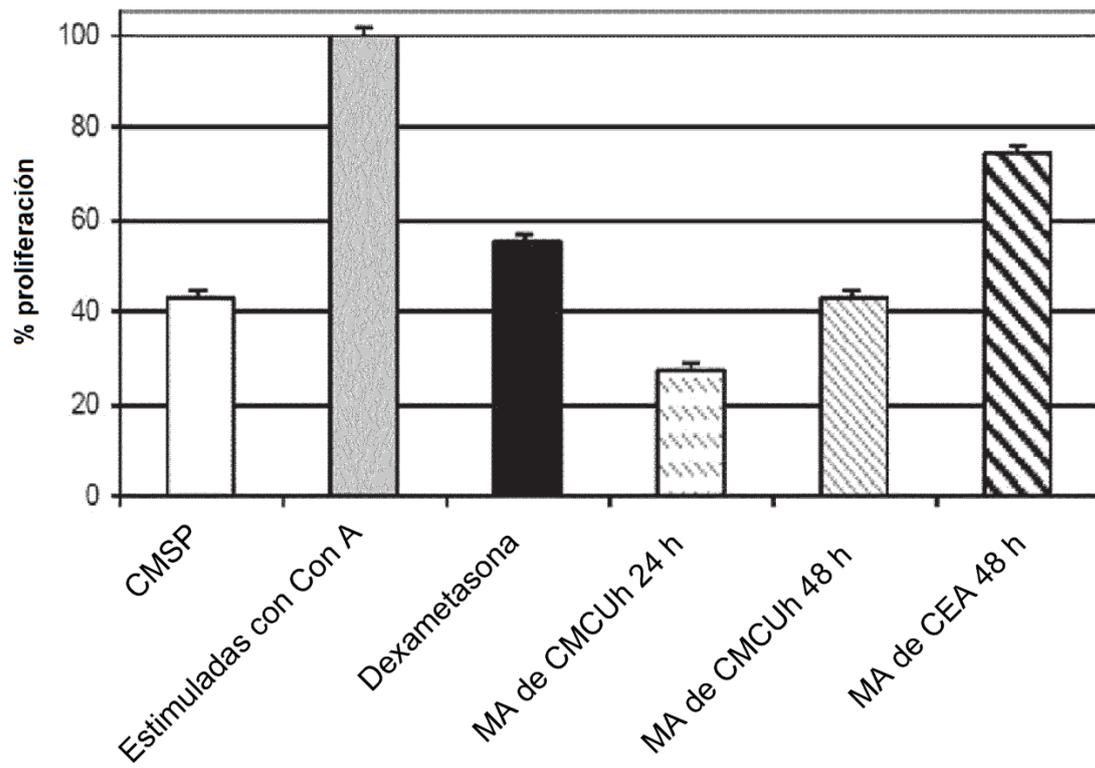
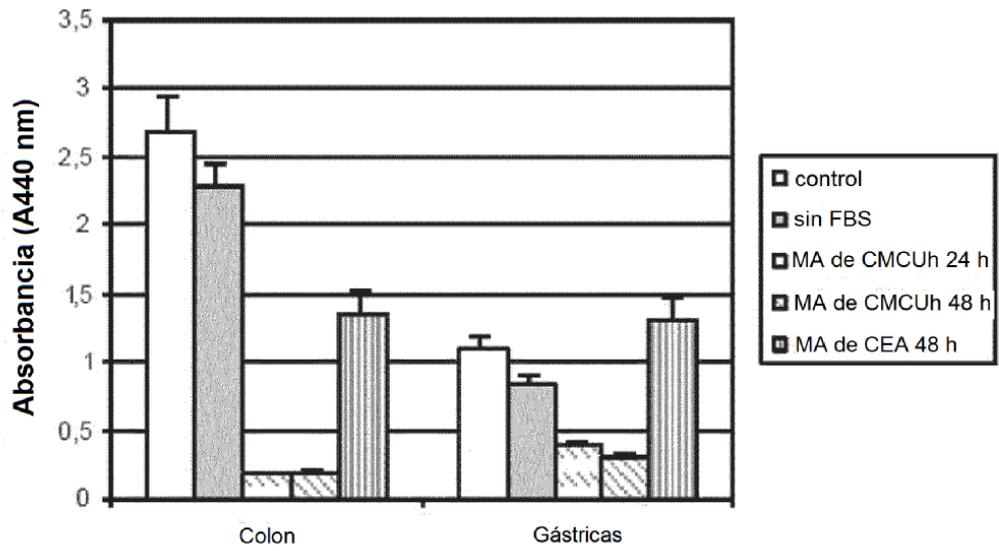


FIG. 7

**A**



**B**

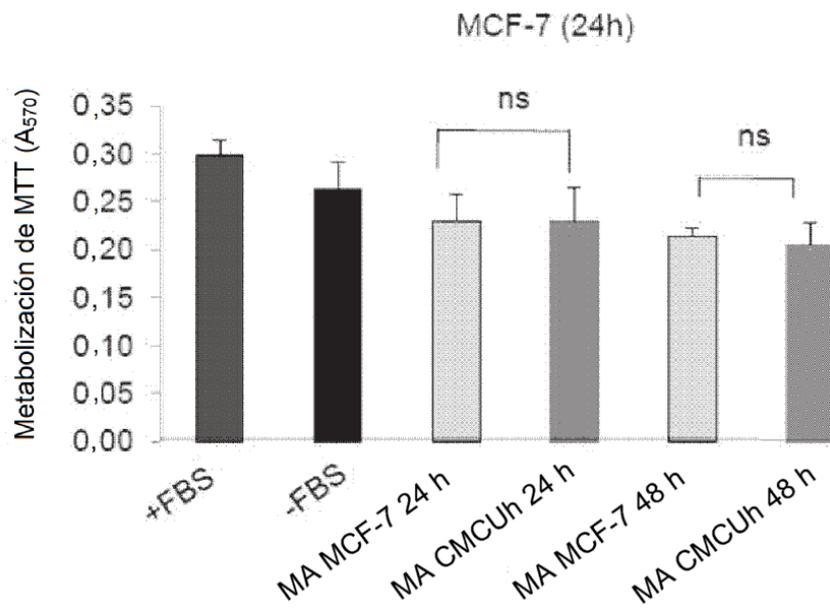
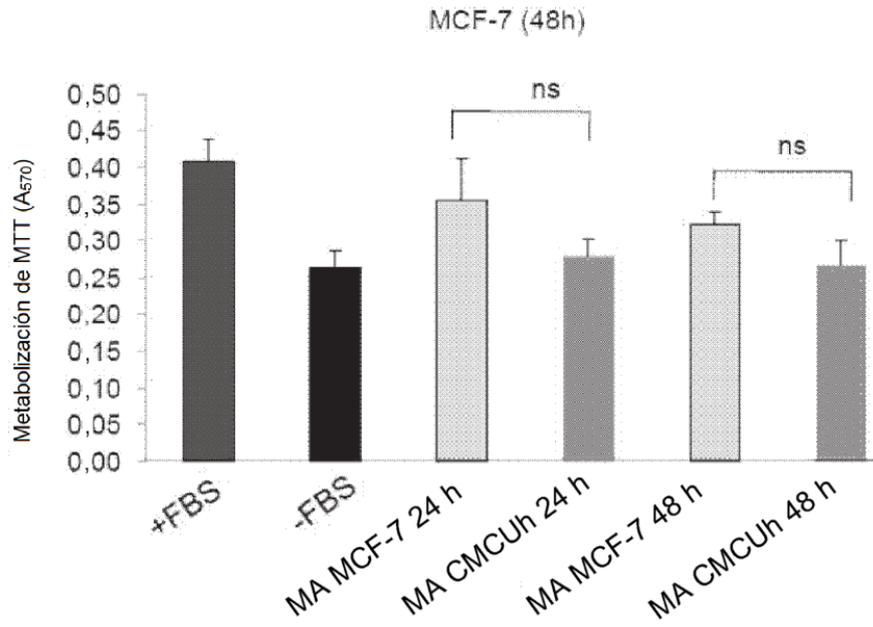


FIG. 7

C



D

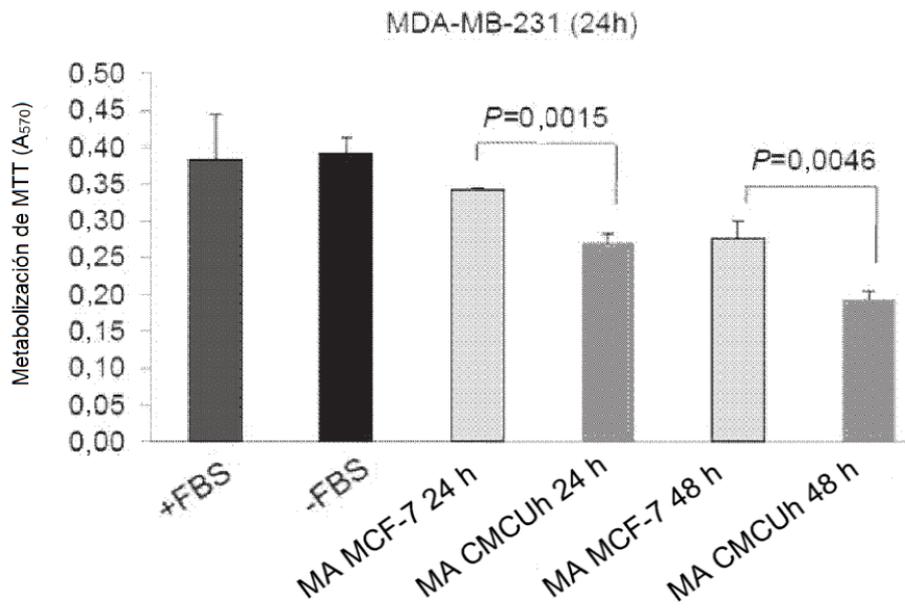


FIG. 7

E

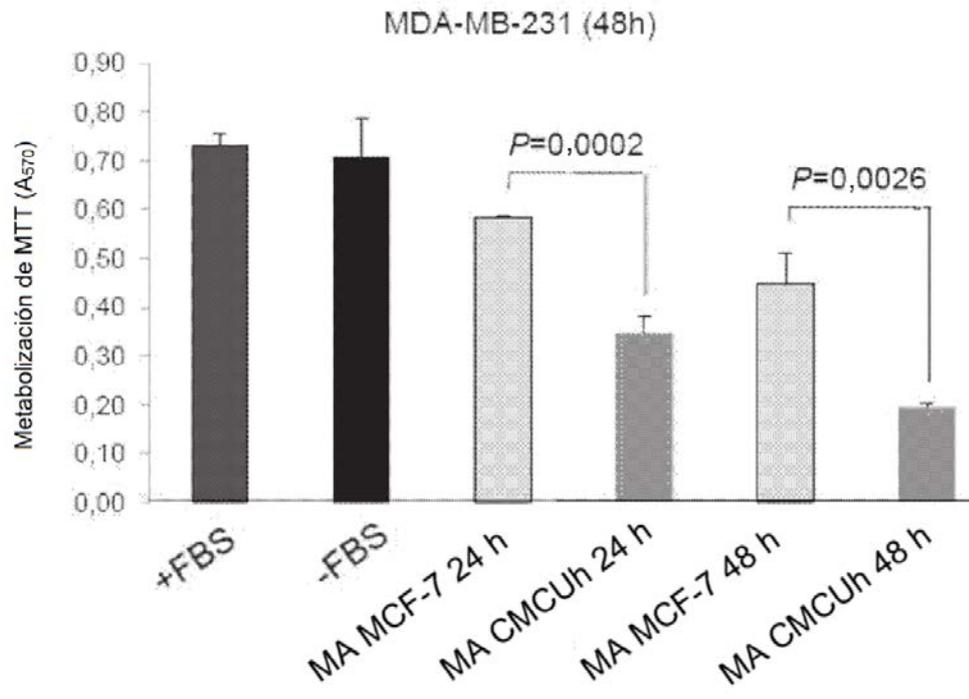


FIG. 7

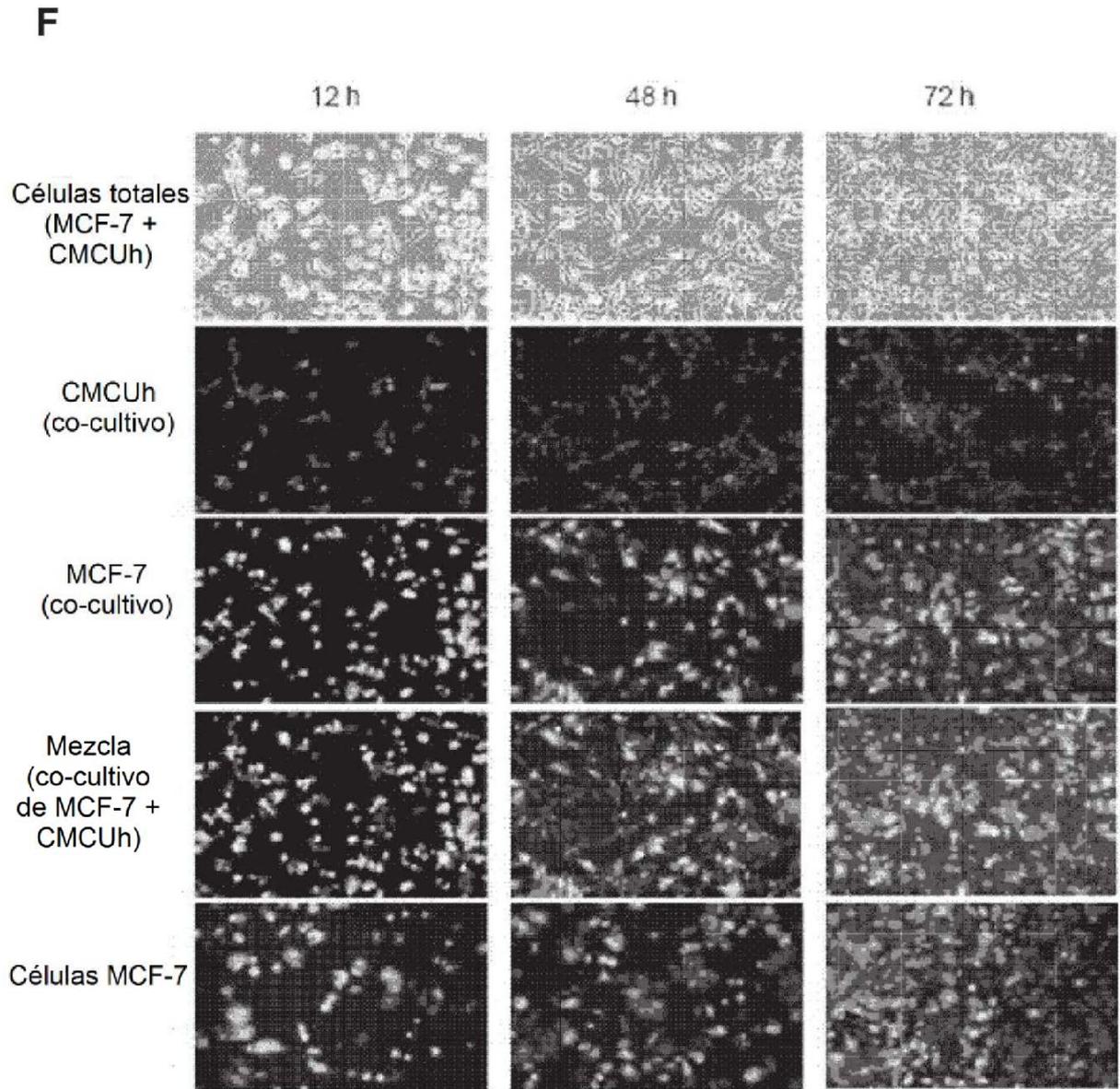


FIG. 7

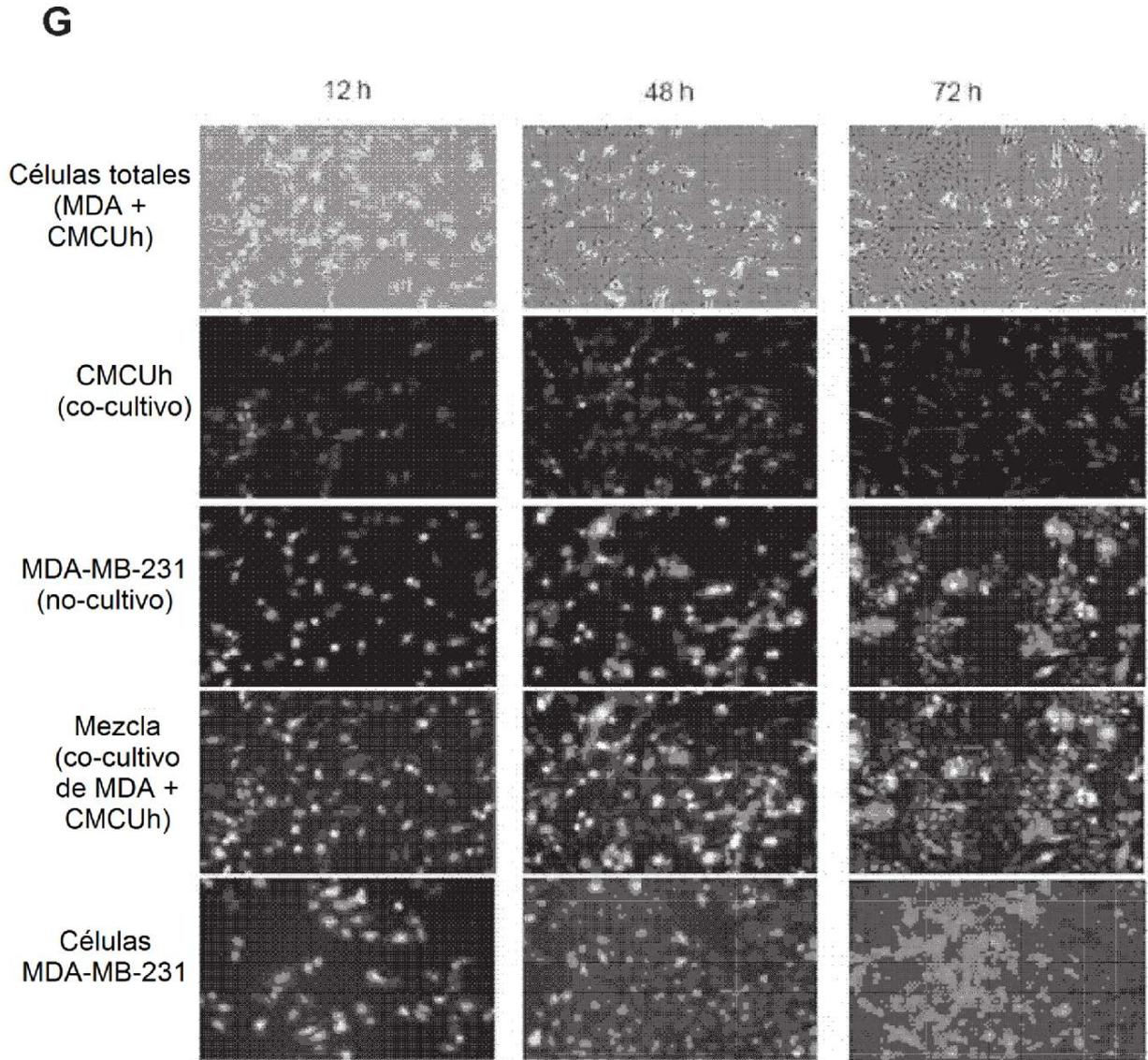


FIG. 8

**A**

————— Células MDA-MB-231 —————

	+FBS	-FBS	+MA
G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> (%)	51,4 ± 4,5	56,4 ± 2,5	65,6 ± 4,1
S (%)	10,9 ± 0,3	7,1 ± 1,9	9,3 ± 0,7
G <sub>2</sub> -M (%)	37,6 ± 4,3	35,8 ± 0,6	25,0 ± 4,3

**B**

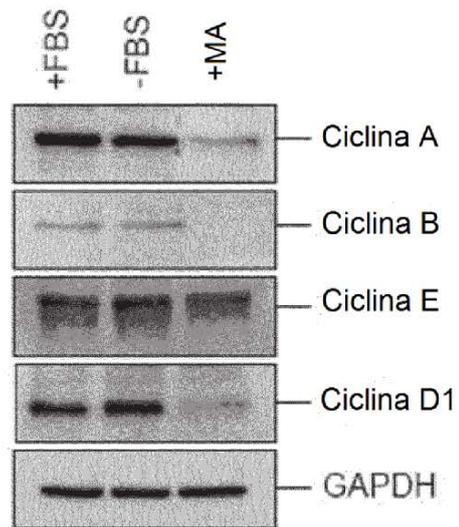


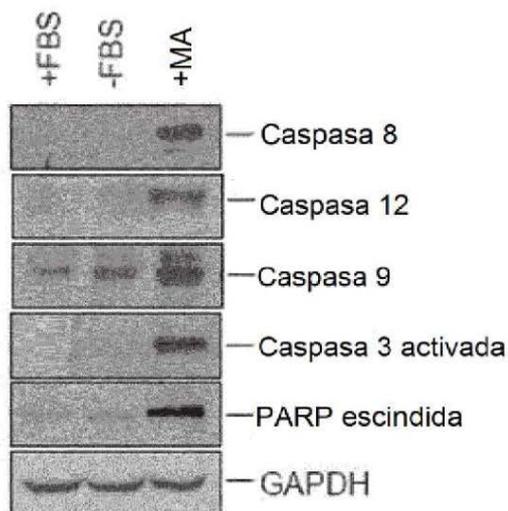
FIG. 8

**C**

————— Células MDA-MB-231 —————

	+FBS	-FBS	+MA
Anexina V- / PI - (%)	85,2 ± 4,8	82,8 ± 4,0	61,5 ± 9,3
Anexina V+ / PI - (%)	5,3 ± 1,2	9,3 ± 1,7	17,8 ± 9,7
Anexina V+ / PI - (%)	5,7 ± 3,8	5,2 ± 1,4	16,7 ± 4,8
Anexina V- / PI - (%)	3,4 ± 1,7	2,4 ± 2,0	3,8 ± 3,6

**D**



**E**

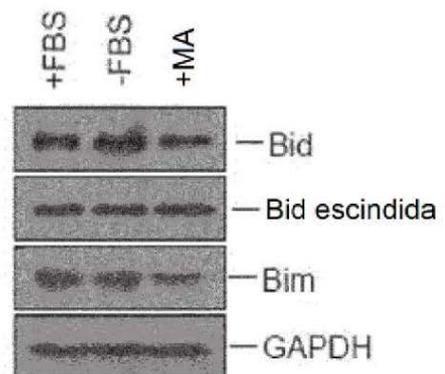
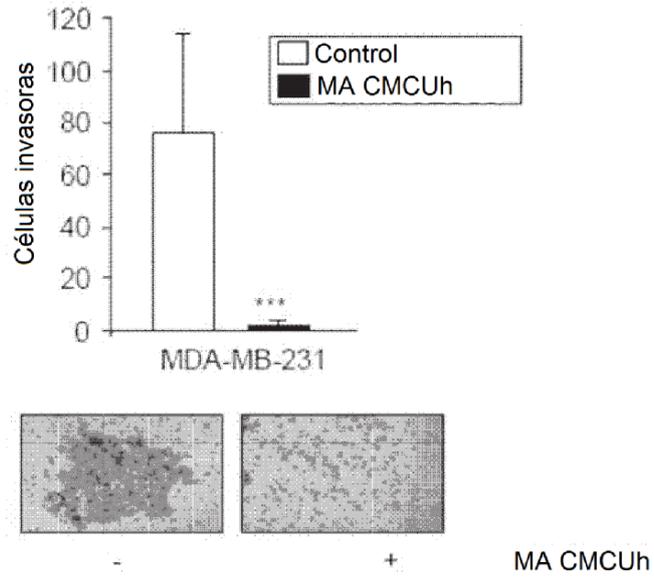


FIG. 9

**A**



**B**

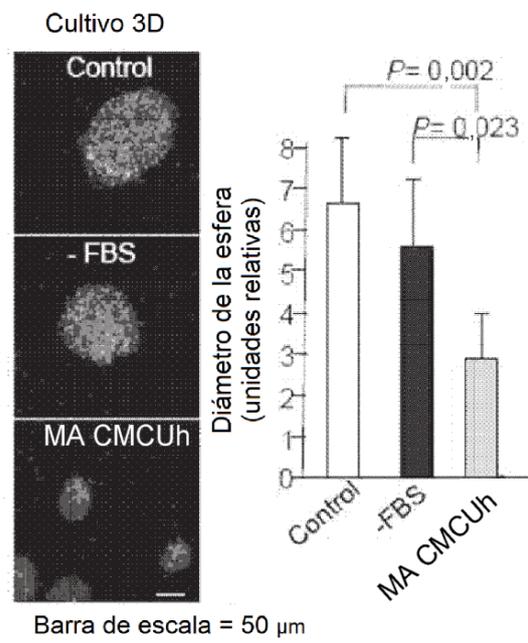


FIG. 9

C

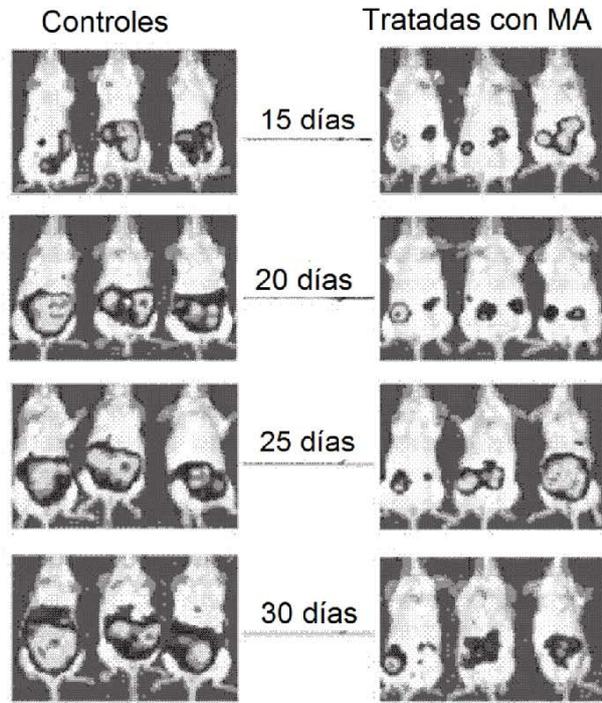


FIG. 9

D

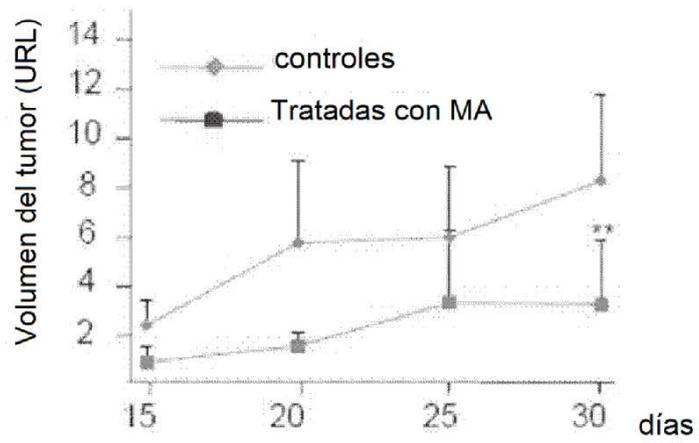
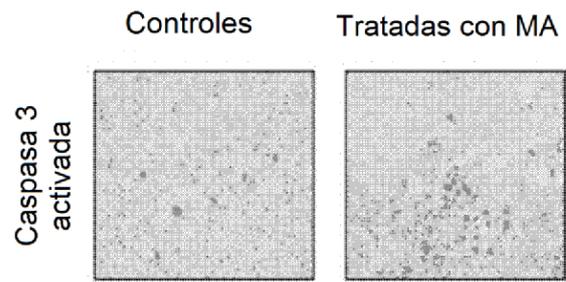


FIG. 9

E



F

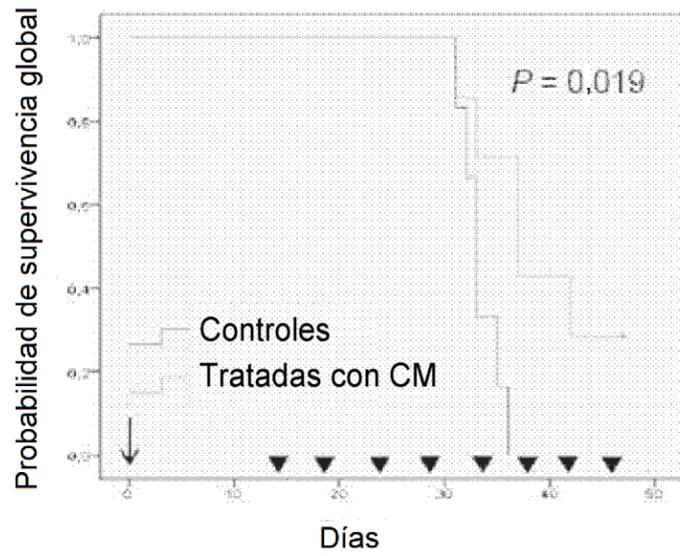


FIG. 10

A

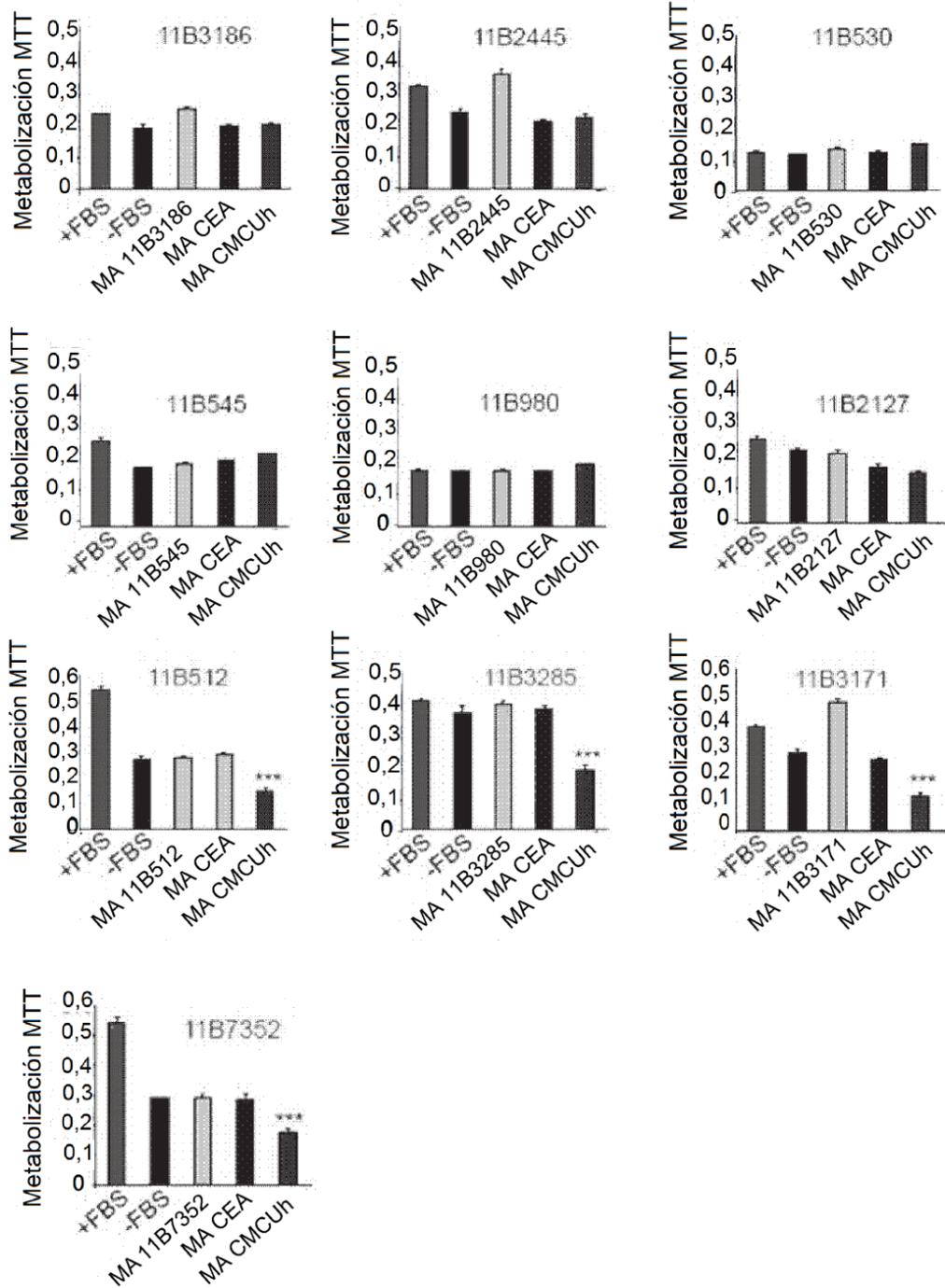


FIG. 10

**B**

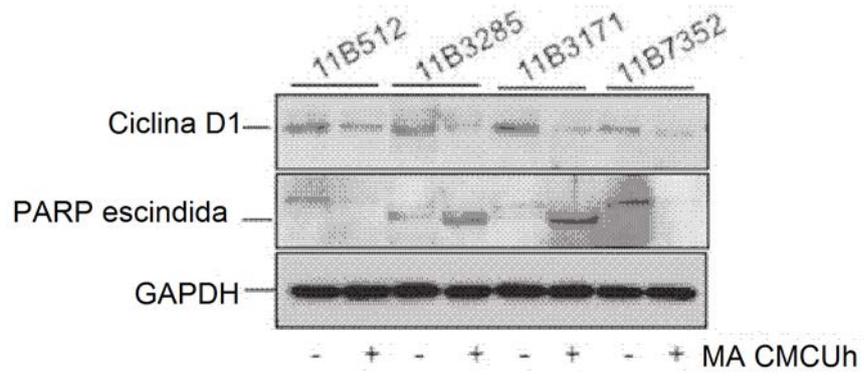
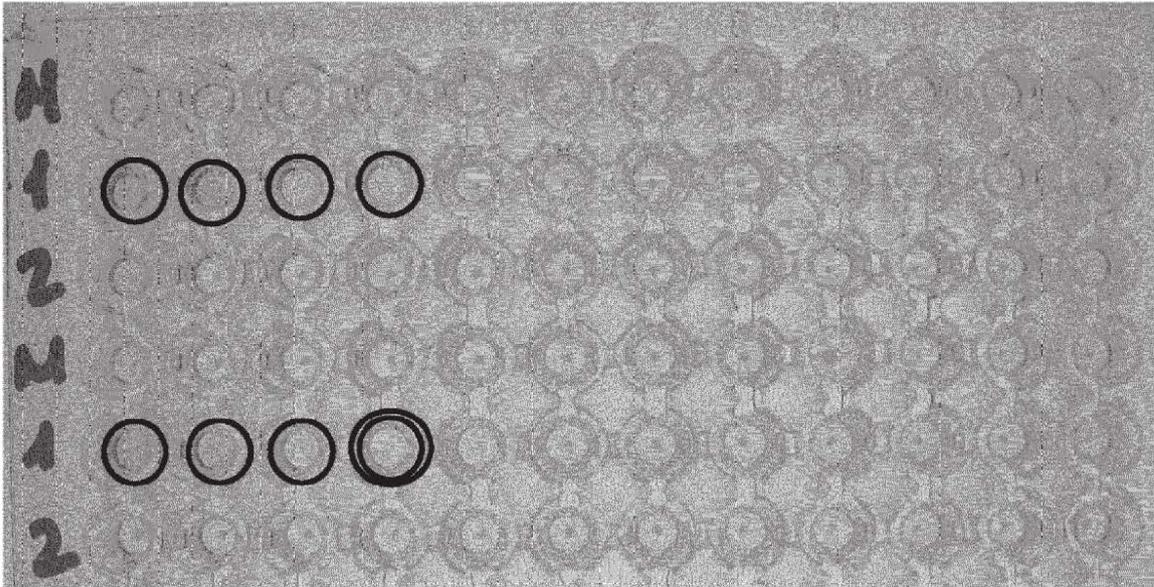


FIG. 11

A



B

M	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,19	0,097	0,048
1	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,19	0,097	0,048
2	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,19	0,097	0,048
M	75	37,5	18,75	9,37	4,68	2,34	1,17	0,58	0,29	0,14	0,073	0,036
1	75	37,5	18,75	9,37	4,68	2,34	1,17	0,58	0,29	0,14	0,073	0,036
2	75	37,5	18,75	9,37	4,68	2,34	1,17	0,58	0,29	0,14	0,073	0,036