

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 232**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2013 PCT/IB2013/059064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14054004**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2013 E 13792477 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2903624**

54 Título: **Medio acondicionado de célula madre mesenquimal placentaria preeclámpsica para su uso en el tratamiento de un tumor**

30 Prioridad:

**02.10.2012 IT TO20120859**

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

**18.07.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ROLFO, ALESSANDRO y  
TODROS, TULLIA**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 720 232 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

Medio acondicionado de célula madre mesenquimal placentaria preeclámpsica para su uso en el tratamiento de un tumor

5

La presente invención se refiere al campo de los tratamientos terapéuticos para patologías tumorales.

10

Durante las últimas décadas, los tratamientos antitumorales lograron avances importantes, permitiendo, por tanto, que un número creciente de casos modificara positivamente el pronóstico, en otro tiempo inexorablemente malo, haciéndolos de este modo tratables y, a veces, curables. Sin embargo, los tratamientos convencionales de los tumores todavía se basan principalmente en intervenciones quirúrgicas, si el sitio del tumor y el estadio de la enfermedad lo permiten. Las intervenciones quirúrgicas normalmente van acompañadas de tratamientos de quimioterapia y/o radioterapia, desafortunadamente asociados con efectos secundarios graves. La quimioterapia se administra de manera sistémica; por lo tanto, sus efectos citotóxicos podrían dirigirse indiscriminadamente tanto al cáncer como a las células sanas, en particular en aquellos tejidos caracterizados por una alta tasa de proliferación. De hecho, la quimioterapia podría causar la aparición de afecciones patológicas adicionales, tales como la mielosupresión y la mucositis. La radioterapia también puede inducir efectos secundarios graves causados esencialmente por daños en el ADN de las células sanas durante la irradiación del área del tumor. Este fenómeno podría incluso dar lugar a la formación de tumores secundarios.

15

20

Por lo tanto, la investigación oncológica clínica se centró en la evaluación de enfoques terapéuticos alternativos que puedan ejercer una acción más específica en las células neoplásicas, por ejemplo, a través del uso de agentes terapéuticos que interfieren selectivamente en los mecanismos celulares activados específicamente durante el crecimiento de las células cancerosas y la invasión metastásica de las células neoplásicas, así como durante la neoangiogénesis tumoral.

25

Entre las soluciones más innovadoras, los tratamientos basados en células madre, incluyendo los enfoques que usan células madre y factores producidos por células madre en condiciones fisiológicas, desempeñan un papel importante.

30

En particular, recientes datos experimentales sugieren que las células madre embrionarias humanas pueden secretar factores tróficos que pueden inhibir selectivamente *in vitro* la proliferación y la oncogénesis de las células cancerosas. De la actividad antitumoral también se informó en células madre mesenquimales (MSC) adultas aisladas de la médula ósea y el tejido adiposo. Por ejemplo, se observó en modelos de ratones *in vivo* que las MSC humanas administradas por vía intravenosa pueden migrar selectivamente hacia el tejido canceroso, integrarse en el estroma tumoral e inhibir la proliferación de las células cancerosas. Tomando como base estos tropismos peculiares de las MSC hacia sitios oncogénesis activos, se han desarrollado recientemente aplicaciones terapéuticas adicionales para las MSC. Estos procedimientos implican el uso de células mesenquimales como vehículos para administrar selectivamente moléculas biológicas con actividad antineoplásica directamente en el área del tumor.

35

40

A pesar de los resultados prometedores mencionados anteriormente, la aplicación de células madre humanas en la práctica clínica es todavía un desafío. Las células madre embrionarias humanas conllevan problemas éticos y de bioseguridad importantes porque su caracterización limitada dificulta el pronóstico de posibles efectos secundarios como la incidencia de tumores secundarios. Por otra parte, el uso terapéutico de MSC implica su extracción de la médula ósea o el tejido adiposo mediante procedimientos altamente invasivos, conjuntamente con la necesidad de exponer estas células a procedimientos de expansión *ex-vivo* difíciles y costosos debido a sus bajas concentraciones naturales (0,001 % de células mononucleadas en la médula ósea).

45

50

Estudios recientes informaron de la presencia en el mesénquima de las vellosidades coriónicas placentarias y en las membranas amnióticas de una población celular particular llamada células madre mesenquimales placentarias (PDMSC) (Huang YC, Yang ZM, Chen XH, Tan MY, Wang J, Li XQ, *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells from human placental decidua basalis and resistance to hypoxia and serum deprivation. *Stem Cell Rev.* 2009;5(3):247-55). Debido a los rasgos característicos únicos del tejido placentario, estas células poseen un fenotipo de célula madre mesenquimal que las proporciona, junto con un elevado potencial de proliferación y diferenciación, el rasgo característico fundamental de tener una duración de su vida bien definida y una tasa de proliferación controlada, reduciendo por tanto el riesgo potencial de formación de tumores secundarios asociados con su uso *in vivo*. Además, las PDMSC pueden ejercer actividades inmunosupresoras y antiinflamatorias.

55

60

Tomando como base de las propiedades plásticas y de diferenciación únicas mencionadas anteriormente, así como la facilidad para recuperar y usar el tejido placentario, las células madre mesenquimales placentarias se han convertido en objeto de intensa investigación, principalmente en el campo de la medicina regenerativa.

65

Rüster B. y colaboradores informaron de que las MSC poseen la capacidad de migrar espontáneamente hacia órganos y tejidos dañados para participar en el proceso reparador (Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on

endothelial cells. Blood. 2006;108(12):3938-44). La ausencia de inmunogenicidad típica de las células madre mesenquimales, debido a la falta de expresión de HLA-II y moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40) necesarias para estimular directamente los linfocitos T y conferir resistencia a la lisis a los linfocitos T citotóxicos, respalda además su aplicación en la medicina regenerativa. Otros estudios demostraron que las PDMSC derivadas de las membranas amnióticas de las placentas fisiológicas pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la proliferación de líneas celulares tumorales (Magatti M, De Munari S, Vertua E, Parolini O. Amniotic Membrane-Derived Cells Inhibit Proliferation of Cancer Cell Lines by Inducing Cell Cycle Arrest. J Cell Mol Med. 2012 Jan 19. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01531.x.) Los autores nombran GM-CSF, IL-6, IFN alfa, IFN beta, TFN alfa y DKK1 como factores antiproliferativos candidatos.

La solicitud de patente internacional n.º WO 2013/093878 divulga el uso de un medio de cultivo acondicionado por células PDMSC aisladas de vellosidades coriónicas de placentas fisiológicas humanas a término para el tratamiento terapéutico del síndrome preeclámpico. La preeclampsia es un síndrome grave relacionado con el embarazo humano caracterizado por una respuesta inflamatoria exacerbada materno-placentaria, daño endotelial generalizado y desarrollo placentario defectuoso.

Ackerman, W.E. *et al.*, IFPA Meeting 2011 workshop report III, PLACENTA, W.B. SAUNDERS, GB, vol. 33, 24 de noviembre de 2011, páginas S-15-S22, divulgan un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias por células madre mesenquimáticas placentarias preeclámpicas, incluyendo el factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MiF) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

Como se ilustrará con más detalles en la siguiente sección experimental, los autores de la presente invención observaron que el medio acondicionado (CM) producido mediante el cultivo en un medio de cultivo líquido de células madre mesenquimáticas placentarias aisladas de placentas humanas afectadas por preeclampsia, ejerce un sorprendente efecto inhibitorio sobre la proliferación tumoral y la angiogénesis. En particular, como se ilustra en la figura 1, el tratamiento de explantes de tejido mamario tumoral primario y metastásico por los medios acondicionados mencionados anteriormente induce una disminución significativa y sorprendente en los niveles de expresión del VEGF ("factor de crecimiento de células endoteliales vasculares") en comparación con los controles, bien conocido como principal factor de crecimiento vascular implicado en los procesos tumorales de neoangiogénesis, y en el factor de transcripción JunB, miembro oncogén de la familia de la proteína activadora 1 (AP-1) cuya expresión está directamente relacionada con un mal pronóstico del cáncer de mama. La eficacia terapéutica de estas células es realmente sorprendente, ya que el medio acondicionado obtenido cultivando células madre mesenquimáticas placentarias fisiológicas ejerce sobre los explantes tumorales un efecto opuesto al estimular la vasculogénesis.

El efecto inhibitorio demostrado experimentalmente ejercido sobre el proceso de angiogénesis y sobre la proliferación de células tumorales, que resultó ser, en particular, eficaz también en tejidos cancerosos en un estadio avanzado, es fuertemente indicativo de la eficacia antitumoral clínica del medio condicionado obtenible mediante el cultivo en un medio de cultivo líquido de células madre mesenquimales placentarias de placentas preeclámpicas humanas.

El enfoque experimental seguido por los autores de la presente invención para identificar las proteínas secretadas por las PDMSC preeclámpicas que contribuyen de manera concertada a los efectos antitumorales del CM descritos anteriormente, se basó en el análisis proteómico del medio mencionado usando una matriz de anticuerpos disponible comercialmente que puede específicamente y de forma simultánea reconocer varias citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento diferentes. Los resultados del análisis proteómico permitieron la identificación de varios factores, mencionados a continuación, entre los cuales son cruciales IP-10 (proteína 10 inducida por el interferón gamma) y TARC (quimiocina regulada por la activación del timo).

Por lo tanto, la materia objeto de la invención es un medio acondicionado (CM) obtenible mediante el cultivo, en un medio basal líquido sin suero, una célula madre mesenquimal placentaria aislada de una placenta preeclámpica y que comprende al menos los factores IP-10 y TARC, para su uso en el tratamiento terapéutico de un tumor.

En la presente descripción, el término "célula madre mesenquimal placentaria de placenta preeclámpica" indica una célula madre mesenquimal derivada de la placenta de una mujer embarazada afectada por el síndrome preeclámpico. El sujeto embarazado es preferentemente un sujeto humano.

Las células madre mesenquimales de origen placentario pertenecen a diferentes poblaciones, tomando como base el tejido placentario de origen. De hecho, la placenta humana posee una estructura única, que incluye tejidos fetales, como el corión (corión frondoso y corión liso) y el amnios, y tejidos derivados de la madre, tal como la decidua.

En un modo de realización preferente, el medio acondicionado que es la materia objeto de la invención, es obtenible cultivando una célula madre mesenquimal placentaria de origen coriónico. Preferentemente, pero de manera no limitativa, la célula madre mesenquimal coriónica se caracteriza por los rasgos característicos de los antígenos de superficie ilustrados en la siguiente tabla, que se detectaron mediante análisis citofluorimétrico.



Debido a la ausencia de inmunogenicidad que caracteriza a las células PDMSC, el medio acondicionado de la invención puede incluir opcionalmente una fracción celular que consiste en las células madre mesenquimales placentarias preeclámpsicas de las que se obtuvo. De forma alternativa, el medio acondicionado no contiene fracciones celulares.

5 El medio acondicionado usado en la invención se puede producir mediante un procedimiento que incluye las siguientes etapas:

- 10 (i) cultivar una célula madre mesenquimal placentaria de una placenta preeclámpsica en un medio de cultivo basal líquido sin suero durante al menos tres horas;
- (ii) separando total o parcialmente la fracción celular del medio de cultivo líquido.

15 En el contexto de la presente descripción, el término "basal" se refiere a un medio de cultivo que contiene las sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas que normalmente se requieren para sustentar el crecimiento de células de mamífero que no tienen necesidades nutricionales especiales. A modo de ejemplo y no de limitación, se citan los siguientes medios de cultivo líquidos, que difieren esencialmente en el contenido de sales y aminoácidos: *Medio basal de Eagle* (BME), *Medio esencial mínimo* (MEM), *Medio de Eagle modificado de Dulbecco* (DMEM), *Mezcla de nutrientes F-10* (HAM's F-10) y *Mezcla de nutrientes F-12* (HAM's F-12). La selección del medio de cultivo más apropiado está dentro de las habilidades de la persona experta en la técnica.

20 De acuerdo con el procedimiento divulgado, el medio de cultivo no está complementado con suero, para evitar que los factores de crecimiento contenidos en el suero interfieran y alteren los efectos causados por los factores específicos secretados por las células PDMSC de placentas preeclámpsicas.

25 Antes de recoger el medio acondicionado, las células madre mesenquimales placentarias de una placenta preeclámpsica se cultivan durante un tiempo suficiente para permitir su adhesión al sustrato de cultivo, su multiplicación y la secreción de los componentes que caracterizan el medio descrito anteriormente y que lo hacen beneficiosamente eficaz para el tratamiento terapéutico de un tumor. Este período de tiempo es de al menos 3 horas, preferentemente al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas o al menos 96 horas o al menos 120 horas o al menos 1 semana o más.

30 Para separar completa o parcialmente la fracción celular del medio acondicionado obtenido a partir de células PDMSC de una placenta preeclámpsica, se puede emplear cualquier procedimiento conocido *per se*. Por ejemplo, el medio acondicionado de la invención se puede filtrar usando complejos de filtración de porosidad adecuada para retener los elementos celulares y sus residuos en suspensión. De forma alternativa, la separación del medio acondicionado de las células PDMSC a partir de las cuales se obtuvo, se puede lograr por la centrifugación y la sedimentación resultante de las propias células. Por lo tanto, en un modo de realización preferente de la invención, la separación del medio acondicionado de la invención a partir de los componentes celulares se realiza por filtración o centrifugación, o una combinación de ambas. La elección del procedimiento de separación está en gran parte dentro del conocimiento y las habilidades técnicas de la persona experta en la técnica.

35 El medio acondicionado usado en la presente invención se puede formular como una composición farmacéutica que comprende al menos las proteínas IP-10 y TARC, identificadas anteriormente como fundamentales para la actividad antitumoral del medio acondicionado que es la materia objeto de la presente invención. Los componentes opcionales adicionales de la composición farmacéutica son las siguientes proteínas: sFIt-1, TNF-alfa, ENA-78, GRO, GRO-alfa, IL-5, IL-7, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-16, MCP-1, MCP-2, MCSF, MDC, ANGIOGENINA, ONCOSTATINA m, VEGF, BDNF, BLC, CKb 8-1, EOTAXINA 2, EOTAXINA 3, FLT-3 LIGAND, FRACTALCINA, GCP-2, GDNF, HGF, IFN-gamma, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, LIF, LIGHT, MCP-3, MCP-4, MIF, MIG, MIP-3 alfa, MIP-1beta, MIP-16, NAP-2, NT-3, OSTEOPONTINA, OSTOPROTEGERINA, PDGFBB, RANTES, SCF, SDF, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TIMP-1 y TIMP-2, EGF, Trombopoyetina, LEPTINA, Eotaxina, FGF-4, FGF-6, FGF-7, FGF-9, IGFBP-3, NT-4, PARC, PIGF, y cualquier combinación de las mismas. Además de las moléculas terapéuticamente activas, la composición farmacéutica incluye excipientes, vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados cuya elección está dentro de las habilidades del técnico promedio en el campo.

55 Preferentemente, la composición farmacéutica está en una formulación adecuada para administración sistémica, más preferentemente por inyección, para garantizar su difusión eficaz en el flujo sanguíneo sistémico. Por supuesto, se pueden usar sistemas inyectivos de cualquier tipo, cuya selección está dentro de las habilidades del experto en la técnica.

60 En un modo de realización alternativo, la composición farmacéutica está en cualquier formulación farmacéutica adecuada para administración oral, cuya selección y preparación está dentro de las habilidades del experto en la técnica.

65 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar además la invención.

**EJEMPLO 1: Aislamiento de células madre mesenquimales a partir de una placenta preeclámpsica (PDMSC)**

5 Las células madre mesenquimales derivadas de placenta (PDMSC) se aislaron de la placa basal de placentas derivadas de embarazos preeclámpsicos.

10 El diagnóstico de preeclampsia se realizó de acuerdo con los criterios establecidos por el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG): presencia de hipertensión inducida por el embarazo (sistólica  $\geq 140$  mm Hg, diastólica  $\geq 90$  mm Hg) y proteinuria ( $\geq 300$  mg/24 h) después de las 20 semanas de gestación en mujeres previamente normotensas. Se excluyeron los embarazos con malformaciones congénitas, anomalías cromosómicas (de número y/o estructura) o infecciones intrauterinas evidentes.

15 La recogida de las placentas y el posterior muestreo de tejido placentario se realizaron después del parto después del consentimiento informado de la paciente y de acuerdo con las directrices del comité de ética del Hospital OIRM Sant'Anna - Mauriziano de Turín.

Las membranas (hojas amnióticas y coriónicas) se separaron mecánicamente de la placa placentaria.

20 Se obtuvo tejido de grosor completo mediante biopsia excisional de la placa basal placentaria (área placentaria formada por vellosidades coriónicas placentarias y en contacto directo con la pared uterina) después de la retirada mecánica de la decidua basal (compuesta de células endometriales maternas modificadas por la interacción con el sincitiotrofoblasto).

25 A continuación, los tejidos de placenta obtenidos por biopsia se lavaron varias veces a temperatura ambiente usando HBSS estéril (solución salina tamponada de Hank, solución acuosa) (Gibco, Invitrogen de Life Technologies) para retirar completamente los residuos de sangre.

30 A continuación, los tejidos obtenidos por biopsia se homogeneizaron y procesaron mecánicamente mediante digestión enzimática usando 100 U/ml de colagenasa I (Gibco, Invitrogen de Life Technologies), 5  $\mu$ g/ml de desoxirribonucleasa I (DNasa I, Invitrogen de Life Technologies) disuelta en DMEM LG (medio esencial mínimo modificado de Dulbecco, bajo en glucosa sin L-glutamina y sin suero fetal bovino, FBS), a 37 °C durante 3 horas en un baño de agua termostatizado en agitación.

35 La suspensión celular resultante se centrifugó a continuación durante 5 segundos, a 540 g a 4 °C para retirar los residuos de tejido no digeridos. El sobrenadante se recogió y se filtró a través de coladores de células con poros de 70 micrones de diámetro. Después de la filtración, la solución se centrifugó durante 5 minutos a 540 g, 4 °C para sedimentar las células. El sobrenadante se descartó a continuación y las células se resuspendieron en HBSS estéril (30 ml por cada 30 gramos del tejido de origen).

40 Se colocó un volumen de Ficoll Paque Premium 1.073 (GE Healthcare Europe) bajo la solución celular obtenida como se describe anteriormente, en la proporción de 1:3 con respecto al volumen inicial. La preparación se centrifugó durante 20 minutos a 540 g, 20 °C y se recogió el anillo de células mononucleares, se situó en la fase media de gradiente, se resuspendió en HBSS (50 ml por cada 30 gramos de tejido original) y se centrifugó durante 10 minutos a 540 g, 20 °C para retirar los residuos de Ficoll.

45 Después de la centrifugación, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en DMEM LG complementado con FBS al 10 % (Gibco, Invitrogen de Life Technologies) y gentamicina al 0,1 %. Las células se colocaron a continuación en placas de cultivo celular y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

50 Las células se mantuvieron en cultivo a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Al 90 % de la confluencia, las células se dividieron por tratamiento con tripsina TrypLE Express (tripsina de origen vegetal sin derivados animales, certificado según las GMP, Invitrogen Life Technologies) para promover la expansión celular.

**EJEMPLO 2: Caracterización de células PDMSC derivadas de una placenta preeclámpsica.**

55 Las células madre mesenquimales aisladas de placentas complicadas por preeclampsia (parte coriónica de la placa basal) como se describe en el ejemplo 1 se caracterizaron por citofluorimetría analizando los principales marcadores antigénicos de superficie típicos de este tipo de células.

60 La presencia o ausencia de estos antígenos se evaluó usando anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (Myltenyi, Bolonia, Italia). Mediante la evaluación de la fluorescencia, se demostró que todas las líneas celulares de PDMSC de placenta preeclámpsica eran positivas para la expresión de los marcadores de superficie CD105, CD166, CD90 y CD73 y negativas para la expresión de HLAII, CD34, CD133, CD20, CD326, CD31, CD45 y CD14, mostrando por tanto un fenotipo mesenquimal apropiado y excluyendo cualquier contaminación de células epiteliales/trofoblásticas y progenitores hematopoyéticos. Además, el análisis del fenotipo celular se realizó mediante experimentos de RT-PCR que mostraron la expresión por las células

PDMSC de los genes Oct4 (factor de transcripción 4 de unión a octámeros) y NANOG (proteína Homeobox NANOG), típicos de las células madre embrionarias.

5 Para evaluar la severidad de las PDMSC, en el tercer pase de cultivo las células se examinaron para determinar su potencial de diferenciación en tres linajes diferentes: osteoblastos, adipocitos y condroblastos. La diferenciación se obtuvo usando medios de inducción específicos. Para la diferenciación osteogénica, los cultivos celulares se incubaron en  $\alpha$ -MEM complementado con FCS al 20 %, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM,  $\beta$ -fosfato-glicerol 20 mM, dexametasona 100 nM y ascorbato-2-fosfato 250  $\mu$ M. Para la diferenciación adipogénica, los cultivos celulares se incubaron con  $\alpha$ -MEM complementado con FCS al 20 %, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin, 12 mM de L-glutamina, 5  $\mu$ g/ml de insulina, indometacina 50  $\mu$ M, dexametasona  $1 \times 10^{-6}$  M y 3-isobutil-1-metilxantina 0,5  $\mu$ M. Para la diferenciación condrogénica, los cultivos se incubaron en medio basal de condrocitos complementado con 1 ml de R3-IGF-1, 2,5 ml de bFGF, 0,5 ml de transferrina, insulina bovina 1 M, 25 ml de FBS y 0,5 ml de gentamicina/anfotericina-B. El medio se cambió dos veces por semana durante tres semanas. La diferenciación celular se evaluó usando coloraciones apropiadas. La diferenciación de los osteoblastos se evaluó mediante tinción con Alizarina Roja S. La alizarina determina la formación de placas de calcio insolubles e intensamente coloreadas, permitiendo por tanto resaltar la matriz ósea. La diferenciación condrogénica se evaluó mediante tinción con azul alciano que forma puentes salinos entre los polianiones de mucopolisacáridos ácidos y permite que los glucosaminoglicanos se tiñan de azul. La diferenciación adipogénica se evaluó mediante tinción con Oil Red, que resalta los lípidos solubilizados por el disolvente presente en la solución de tinte y los depósitos de grasa son de color rojo.

### **EJEMPLO 3. Producción de los medios Acondicionados.**

25 Para obtener el medio acondicionado que es la materia objeto de la invención, las PDMSC preeclámpicas se colocaron en placas entre los pasos 3 a 5, cuando alcanzaron el grado apropiado de pureza, como demuestra la ausencia de células contaminantes trofoblásticas y/o hematopoyéticas derivadas del tejido placentario de origen. Específicamente, las células se colocaron en placas a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml en DMEM LG sin suero fetal bovino (FBS) a una temperatura de 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las PDMSC se cultivaron durante al menos 30 3 horas a una semana o más. Los medios acondicionados se recogieron a continuación en los puntos temporales establecidos, posteriormente se centrifugaron y/o se filtraron para retirar los desechos celulares contaminantes. Cuando era necesario, los medios acondicionados obtenidos como se acaba de describir se podían conservar congelándolos a -80 °C.

### **EJEMPLO 4: Análisis del medio acondicionado por matriz de citocinas.**

35 El kit RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 disponible comercialmente, que permite el análisis simultáneo de 80 citocinas diferentes en la misma muestra, se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para investigar el perfil de las citocinas secretadas por células PDMSC preeclámpicas y que están presentes en el medio acondicionado de la invención. Específicamente, el procedimiento se basa en anticuerpos localizados en 40 una membrana de matriz y que pueden reconocer y capturar las citocinas cuando están presentes en la muestra analizada. En el contexto de este experimento, las señales generadas en la membrana de matriz en los sitios de formación de inmunocomplejos se cuantificaron mediante análisis densitométrico usando el software ImageQuant. Los niveles de expresión de las citocinas identificadas no se determinaron como valores absolutos, sino que se normalizaron como porcentaje en comparación con un grupo de controles estándar incluidos en el 45 kit, asignando a los controles positivos el valor 100 % y a los controles negativos un valor del 0 %. Los resultados del experimento descrito anteriormente se muestran en la siguiente tabla:

Proteína	% con respecto al estándar
ENA-78	38,1 %
GRO	79,4 %
GRO-alfa	11,1 %
IL-6	105,8 %
IL-7	6,4 %
IL-8	128,9 %
MCP-1	74,1 %
MCP-2	8,7 %
MCSF	6,9 %
MDC	5,1 %
ANGIOGENINA	25,8 %

ES 2 720 232 T3

Proteína	% con respecto al estándar
ONCOSTATINA m	8,5 %
VEGF	27,9 %
BDNF	19,8 %
BLC	10%
CKb 8-1	4,8 %
EOTAXINA2	2,5 %
EOTAXINA3	1,3 %
LIGANDO FLT-3	11,6 %
FRACTALCINA	12,4 %
GCP-2	8,5 %
GDNF	8,3 %
HGF	2,1 %
IGFBP-1	3,8 %
IGFBP-2	14,5 %
IGFBP-4	16,9 %
IP-10	16,7 %
LIF	13,6 %
LIGHT	7,6 %
MCP-4	23,3 %
MIF	11 %
MIP-3 alfa	4,3 %
NAP-2	16 %
NT-3	20,2 %
OSTEOPONTINA	43,7 %
OSTOPROTEGERINA	35 %
TGF-beta 2	29,9 %
TIMP-1	33,4 %
TIMP-2	71,4 %
MIG	7 %
IL-5	2,7 %
TGF-β3	8,7 %
MIP-1 beta	13,7 %
PDGFBB	13,8 %
SDF	7,1 %
IL-10	2,7 %
IL-15	5,4 %
IFN-gamma	3,5 %
MCP3	13,3 %
MIP-1β	1,5 %
RANTES	7,4 %
SCF	5,2 %
TARC	15,4 %

Proteína	% con respecto al estándar
TGF-beta 1	6,8 %
TNF-alfa	11,1 %
EGF	4,7 %
Trombopoyetina	1,7 %
LEPTINA	14,9 %
Eotaxina	2,3 %
FGF4	2,4 %
FGF6	7 %
FGF7	3,9 %
FGF9	9,8 %
IGFBP-3	3,4 %
IL-16	5,4 %
NT-4	2 %
PARC	9,8 %
PIGF	12,8 %

Además, el análisis de citocinas no detectó la presencia de las siguientes proteínas en el medio condicionado objeto de la invención, porque estaban ausentes o por debajo del límite de detección de la matriz: GM-CSF, I-309, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, p40p70, IL-13, MIP-1, TNF-beta, IGF-I, IGFBP-4, TGF-beta 3.

5

Se detectó sFlt-1 antiangiogénica, producido por células madre mesenquimales preeclámpsicas, mediante PCR en tiempo real (reacción en cadena de la polimerasa, para evaluar los niveles de expresión génica) y análisis de inmunoelectrotransferencia (para evaluar los niveles de expresión de proteínas). La PCR en tiempo real se realizó en el ARNm (ARN mensajero) aislado de las células placentarias mencionadas anteriormente derivadas de placentas preeclámpsicas usando un conjunto personalizado específico de cebadores y sonda TaqMan producidos por Life Technologies-Applied Biosystems Division siguiendo nuestra solicitud. Estos cebadores y sondas se basaron en las secuencias publicadas previamente por Nevo O. *et al.* J. Clin. Endocrinol Metab. 2008 93:285-292. El análisis de inmunoelectrotransferencia se realizó utilizando un anticuerpo policlonal específico anti-sFlt-1 adquirido de Life Technologies-Invitrogen (número de catálogo 36-1100), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los análisis de PCR en tiempo real e inmunoelectrotransferencia mostraron un aumento significativo de la producción de sFlt-1 por las células madre mesenquimales placentarias preeclámpsicas en comparación con los controles fisiológicos en los niveles tanto de genes (aumento de 4,5 veces,  $p < 0.001$ ) como de proteínas (aumento de 2 veces,  $p < 0,05$ ).

10

15

#### **EJEMPLO 5: Evaluación de la eficacia terapéutica del medio acondicionado obtenido a partir de células PDMSC cultivadas procedentes de una placenta preeclámpsica**

Para evaluar la eficacia terapéutica del medio acondicionado objeto de la invención, se han realizado estudios específicos usando modelos *in vitro* representados por explantes de tejido tumoral extirpados de tumores primarios y metastásicos obtenidos de pacientes que se sometieron a cirugía para la extirpación del cáncer de mama y sus metástasis. En particular, se verificó si el tratamiento de dichos explantes con el medio acondicionado de la invención induce una reducción de los niveles de expresión de VEGF, JunB y PARP, y un aumento de la expresión de Caspasa 3 (CASP3) y p16INK4a, como indicación de una actividad antiangiogénica y antitumoral significativa. Diversos datos clínicos y experimentales demostraron que el VEGF está sobreexpresado en el cáncer y que es un índice de un gran malignidad tumoral, ya que induce la formación de nuevos vasos que aportan nutrientes al tejido tumoral. JunB es un oncogén cuya expresión está directamente asociada con un mal pronóstico del cáncer de mama. PARP (Poli- (ADP-ribosa)-polimerasa) es una proteína nuclear que repara los daños en el ADN causados por agentes quimioterápicos, confiriendo por tanto al tejido tumoral resistencia a la quimioterapia. CASP3 y p16INK4A son dos potentes oncosupresores que pueden inducir la apoptosis y bloquear la proliferación celular.

25

30

35

Para los procedimientos experimentales, se usaron muestras de tejido tumoral, extirpadas de los residuos tisulares obtenidos de tres pacientes diferentes después de los procedimientos anatomopatológicos posoperatorios de rutina. De cada tumor, se extirparon ocho explantes y se cultivaron en insertos rellenos de Matrigel. Los cultivos se trataron durante 48 horas usando el medio acondicionado obtenido mediante el cultivo de PDSMC preeclámpsicas durante 48 horas como se describe anteriormente.

40

En detalle, los explantes, que consistían en un tejido tumoral primario (5 mm de diámetro) con morfología y estructura conservadas y de igual peso, se extirparon, se colocaron en placas sobre el inserto que contenía 150 µl de Matrigel y se mantuvieron en 500 µl de medio HAM F12 sin FBS durante 12 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> para equilibrar sus condiciones después del estrés posoperatorio. Después de 12 horas, el medio se intercambió con 500 µl de medio acondicionado (12 explantes) o con 500 µl de medio DMEM LG sin suero (12 explantes de control). Los cultivos se incubaron durante 48 horas más en las mismas condiciones experimentales. Al final del experimento, los explantes tratados y de control se recogieron y procesaron para el aislamiento del ARNm usando el reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez aislado, el ARNm se purificó mediante tratamiento con ADNasa (Sigma-Aldrich) para eliminar las contaminaciones del ADN genómico. La concentración de ARN se determinó mediante lectura del espectrofotométrica a una longitud de onda de 260 nm, mientras que la pureza del ARN se valoró evaluando la proporción de absorbancia A260/A280 en 1,8-2.

El ADNc (ADN complementario), útil para el análisis posterior realizado para investigar los niveles de expresión de VEGF, JunB, PARP, CASP3 y p16INK4a, se sintetizó mediante RT-PCR a partir de 5 microgramos de ARN total extraído previamente usando un enfoque de hexámeros aleatorios y el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Life Science) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

El análisis de la expresión génica de VEGF, JunB, PARP, CASP3 y p16Ink4A después del tratamiento de cultivos tumorales con el medio acondicionado de la invención, se realizó mediante PCR en tiempo real usando cebadores y sonda TaqMan (Life Technologies-Applied Biosystem Division). Para realizar una cuantificación relativa, las señales de PCR en tiempo real se compararon entre los dos grupos de muestras después de la normalización con las señales de la subunidad 18S ribosomal, usadas como referencia interna.

Los resultados de la expresión génica diferencial, representados por los histogramas de los que se informa en la figura 1 y la figura 2, demostraron claramente que el tratamiento con el medio acondicionado (CM) objeto de la invención indujo una reducción estadísticamente significativa de los niveles de expresión de los genes VEGF, JunB y PARP acompañados de un incremento de los niveles de expresión de los genes CASP3 y p16Ink4A en los explantes tumorales ( $p < 0,05$ ).

30

**Reivindicaciones**

- 5      **1.** Un medio acondicionado obtenible cultivando una célula madre mesenquimal placentaria de una placenta preeclámpsica en un medio de cultivo líquido basal sin suero, comprendiendo el medio acondicionado al menos proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10) y quimiocina regulada por la activación del timo (TARC), para su uso en el tratamiento terapéutico de un tumor.
- 10      **2.** El medio acondicionado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tumor es un tumor epitelial.
- 15      **3.** El medio acondicionado para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el tumor es un tumor de mama.
- 20      **4.** El medio acondicionado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio acondicionado comprende además al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en tirosina cinasa 1 similar a fms soluble (sFlt-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), y cualquier combinación de las mismas.
- 25      **5.** El medio acondicionado para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el medio acondicionado comprende además una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en ENA-78, GRO, GRO-alfa, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-16, MCP-1, MCP-2, MCSF, MDC, ANGIOGENINA, ONCOSTATINA m, VEGF, BDNF, BLC, CKb 8-1, EOTAXINA 2, EOTAXINA 3, LIGANDO FLT-3, FRACTALCINA, GCP-2, GDNF, HGF, IFN-gamma, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, LIF, LIGHT, MCP-3, MCP-4, MIF, MIG, MIP-3 alfa, MIP-1 beta, MIP-16, NAP-2, NT-3, OSTEOPONTINA, OSTOPROTEGERINA, PDGFBB, RANTES, SCF, SDF, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TIMP-1 y TIMP-2, EGF, Trombopoyetina, LEPTINA, Eotaxina, FGF-4, FGF-6, FGF-7, FGF-9, IGFBP-3, NT-4, PARC, PIGF, y cualquier combinación de las mismas.
- 30      **6.** El medio acondicionado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la célula madre mesenquimal placentaria tiene un origen coriónico o amniótico.
- 35      **7.** El medio acondicionado para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que está libre de células.
- 35      **8.** El medio acondicionado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la célula madre mesenquimal placentaria de una placenta preeclámpsica tiene origen humano.

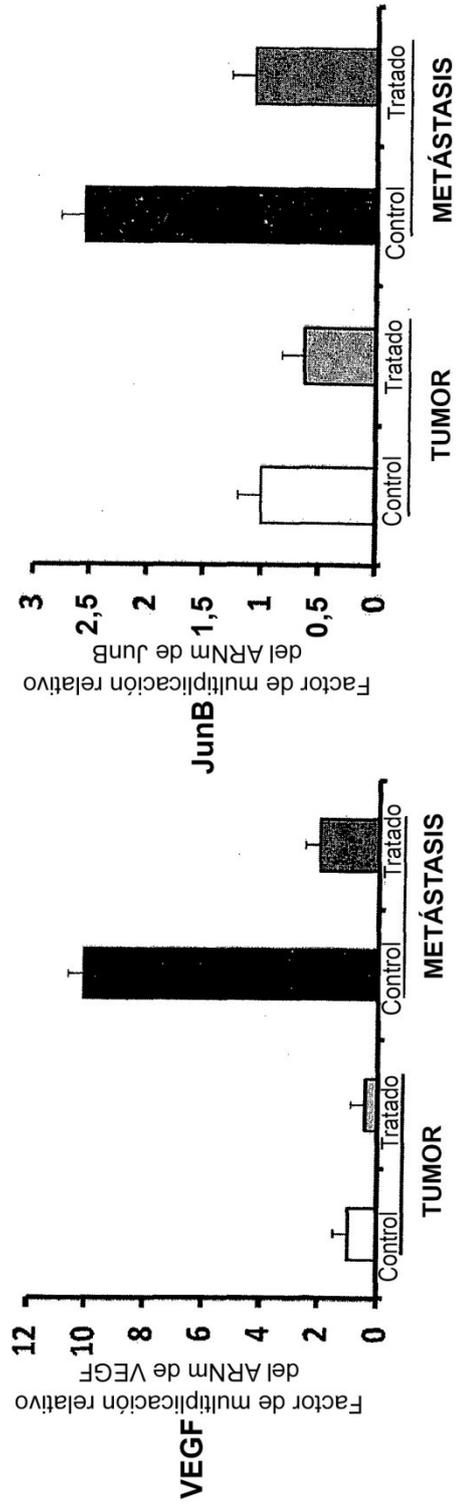


FIG.1

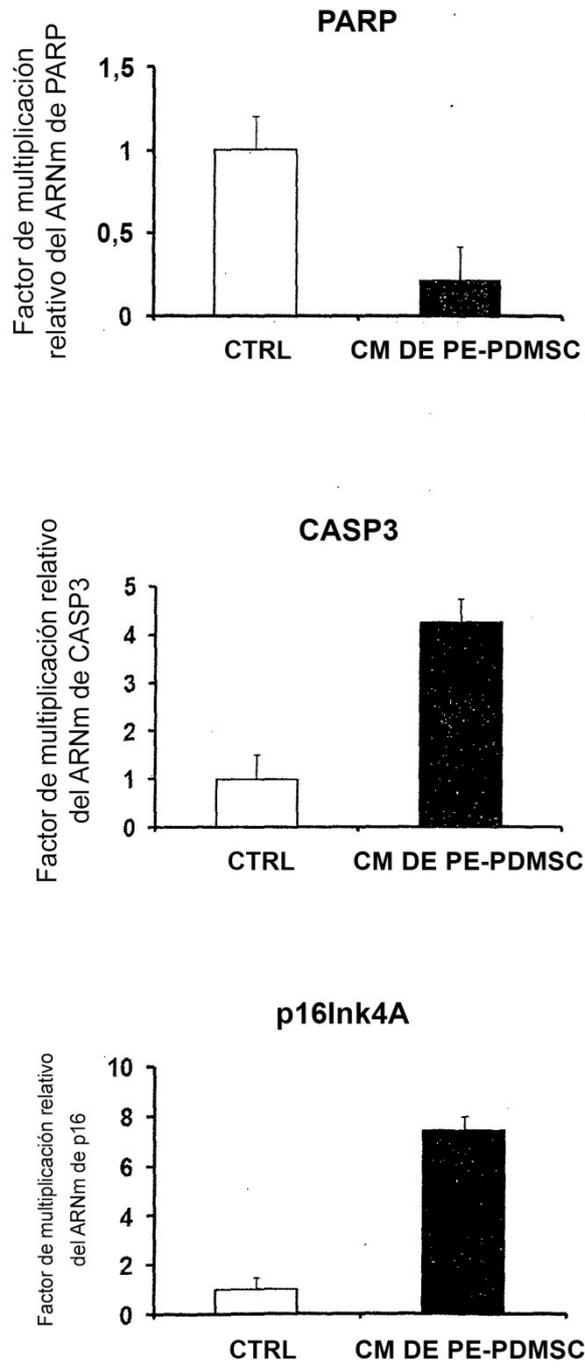


FIG.2