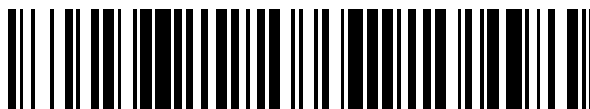


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 348**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/35 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2010** **PCT/EP2010/069049**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011** **WO11070001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2010** **E 10788321 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019** **EP 2510085**

54 Título: **Medio acondicionado derivado de células madre adultas y/o células madre adultas para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad tumoral**

30 Prioridad:

09.12.2009 EP 09425504

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

06.04.2020

73 Titular/es:

**FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND
GMBH (100.0%)
Else-Kröner-Strasse 1
61352 Bad Homburg, DE**

72 Inventor/es:

**HERRERA SANCHEZ, MARIA, BEATRIZ;
FONSATO, VALENTINA;
TETTA, CIRO y
CAMUSSI, GIOVANNI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 752 348 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 derivado de células madre adultas y/o células madre adultas para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad tumoral

La presente invención se refiere al campo del tratamiento terapéutico de enfermedades tumorales.

5 Las células cancerosas metastásicas comparten muchas características con las células madre, tales como su capacidad de autorrenovarse y generar una progenie diversa. Además, el fenotipo de las células madre y las células cancerosas está profundamente influenciado por el microambiente. Al mismo tiempo, se ha demostrado que los microambientes embrionarios inhiben la tumorigenicidad de una variedad de estirpes celulares de cáncer. Se demostró que la exposición de las células de melanoma metastásico a un microambiente embrionario de pez cebra, antes de la gastrulación, produce su reprogramación hacia un fenotipo no tumorigénico (Cucina A., *et al.* (2006). "Zebrafish embryo proteins induce apoptosis in human colon cancer cells (Caco2)". *Apoptosis* 11:1615-1628; Lee L. M., *et al.* (2005). "The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: Assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation". *Dev Dyn* 233:1560-1570). Además, las células de melanoma metastásico trasplantadas en embriones de pollo en desarrollo son capaces de seguir las vías de migración de la cresta neuronal, produciendo una pérdida de tumorigenicidad y la adquisición de un fenotipo de tipo cresta neuronal. Estudios recientes han demostrado que el microambiente de células madre embrionarias humanas (hESC) neutraliza específicamente la expresión del morfogén embrionario Nodal en células de melanoma metastásico y de carcinoma de mama, reprogramando a un fenotipo menos agresivo (Postovit L. M. *et al.* (2008). "Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells". *PNAS* 105: 4329-4334). Postovit L. M. *et al.* descubrieron a LEFTY secretado por las hESC, un inhibidor de la señalización de Nodal, como uno de los mediadores importantes de estos fenómenos. Estos estudios demostraron que el microambiente de las células madre embrionarias proporciona una entidad terapéutica no explorada hasta el momento para la regulación de factores embrionarios expresados de manera aberrante en células tumorales agresivas.

25 En Giuffrida D. *et al.* "Human embryonic stem cells secrete soluble factors that inhibit cancer cell growth". *Cell Prolif.* 1 de septiembre de 2009, se demostró que la inhibición de la proliferación de estirpes de células de cáncer epitelial humanas está mediada por factores solubles producidos por las hESC. Los autores descubrieron que el aumento de la proporción de células cancerosas en la fase G(1) mediante el tratamiento con MA de hESC, acompañado de la disminución de las células en las fases S y G(2)/M, sugiere que estos factores ralentizan la progresión de las células cancerosas mediante la inhibición del ciclo celular.

30 El documento WO 2008/020815 desvela la preparación de medios acondicionados de células madre a partir de MSC que se derivan de ESC. Entre los posibles usos de dichos medios acondicionados, se menciona el tratamiento del cáncer.

35 Sin embargo, dichos resultados se han logrado mediante células madre embrionarias, que son difíciles de obtener y que suscitan preocupaciones desde el punto de vista tanto ético como metodológico, ya que es necesario destruir el embrión para obtener las células madre embrionarias. Asimismo, las células madre embrionarias pueden sufrir una proliferación incontrolada tras el trasplante *in vivo*.

40 Los presentes inventores desvelaron en la solicitud de patente internacional publicada como WO 2006/126219 células madre/progenitoras hepáticas no ovaladas adultas humanas (HLSC) que expresan marcadores de células madre tanto mensénquimales como embrionarias, y que tienen capacidades de diferenciación multipotente y propiedades regenerativas.

Aunque en el documento WO2006126219 las HLSC se definieron como "células progenitoras pluripotentes", se ha de entender que las expresiones "células progenitoras" y "células madre" se refieren a células que son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en tipos de células especializadas (es decir, diferenciadas).

45 Asimismo, los términos "multipotente" y "pluripotente" se consideran intercambiables dentro del contexto de la presente descripción, ya que ambos se refieren a la capacidad de una célula madre/progenitora para diferenciarse en una pluralidad de tipos de células especializadas (diferenciadas). Dentro de dicho contexto, la expresión "una pluralidad" significa al menos dos, preferentemente, al menos tres, tipos de células especializadas (diferenciadas).

50 En el contexto de la presente descripción, la expresión "célula madre adulta" significa una célula madre que está aislada de un tejido adulto, en contraste con una "célula madre embrionaria", que está aislada de la masa celular interna de un blastocisto. Las células madre adultas también se conocen como "células madre somáticas".

Se demostró que las células madre/progenitoras pluripotentes hepáticas no ovaladas humanas desveladas en el documento WO 2006/126236 se diferencian en una variedad de tipos de células tisulares (concretamente, células hepáticas maduras, células epiteliales, células productoras de insulina y células osteogénicas) y que ejercen efectos

de regeneración de los órganos. Dichas células se derivan de una estirpe celular progenitora pluripotente hepática humana no ovalada que expresa marcadores de células hepáticas. Dichas células se aíslan mediante un método que comprende las etapas de:

- 5 (i) cultivar hepatocitos maduros humanos derivados de hígado adulto en un medio de cultivo celular hasta la muerte de los hepatocitos maduros y la selección de una población de células supervivientes que tengan una morfología epitelioide;
- (ii) expandir la población de células supervivientes que tienen morfología epitelioide mediante el cultivo en un medio de cultivo que contiene suero y glucosa complementado con hEGF (factor de crecimiento epitelial humano) y bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos), y que comprende las sales inorgánicas, amino ácidos y vitaminas
- 10 habituales que se necesitan para el crecimiento de las células de mamíferos

y, en particular, en donde los hepatocitos maduros se congelan en un medio de cultivo que contiene suero en presencia de un agente crioprotector y luego se descongelan antes del cultivo de acuerdo con la etapa (i).

- 15 La caracterización de las células madre/progenitoras hepáticas no ovaladas humanas desveladas en el documento WO 2006/126236 y del método de preparación de las mismas se incorporan en el presente documento en su totalidad como referencia.

También se conoce en la técnica que los preparados de células madre mesenquimales (MSC) ejercen un efecto regenerativo en algunos tejidos. Por ejemplo, se sabe que las MSC derivadas de la médula ósea apoyan de manera natural la hematopoyesis al secretar una serie de moléculas tróficas, incluyendo las glucoproteínas de la matriz extracelular soluble, las citocinas y los factores de crecimiento.

- 20 Sin embargo, algunos preparados de células madre tienen la desventaja principal de causar reacciones inmunitarias cuando se administran. Algunos preparados de células madre incluso tienen el potencial de causar cáncer.

El documento WO 2009/105044 desvela medios acondicionados de MSC. Entre los posibles usos de dichos medios acondicionados, se menciona el tratamiento del cáncer.

- 25 Los presentes inventores han descubierto ahora que el medio acondicionado (MA) producido mediante el cultivo, en un medio líquido de cultivo celular, de una célula madre adulta que está lo suficientemente indiferenciada para ser capaz de dar lugar a una pluralidad de tipos de células diferenciadas, en concreto, una célula madre hepática no ovalada, muestra inesperadamente una eficaz actividad antitumoral, como lo demuestran los experimentos *in vitro* e *in vivo* que se ilustran a continuación en el apartado experimental de la descripción.

- 30 El medio acondicionado (MA) adecuado para su uso en la aplicación terapéutica antitumoral de la invención comprende una pluralidad de moléculas y biomoléculas, en particular, proteínas, más concretamente, citocinas, secretadas por las células madre hepáticas no ovaladas durante el cultivo.

- 35 Así pues, un primer aspecto de la presente invención es un medio acondicionado que comprende una pluralidad de proteínas secretadas por células y que se puede obtener cultivando, en un medio líquido de cultivo celular, una célula madre adulta capaz de diferenciarse en una pluralidad de tipos de células diferenciadas, para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad tumoral, caracterizado por que la célula madre adulta capaz de diferenciarse en una pluralidad de tipos de células diferenciadas es una célula madre hepática no ovalada.

- 40 En una realización preferida, el medio acondicionado está libre de células. En otra realización, el medio acondicionado comprende una fracción celular que consiste en la célula madre adulta a partir de la que se puede obtener el medio acondicionado. Como alternativa, la propia célula madre adulta como se ha definido anteriormente se usa para el tratamiento terapéutico de una enfermedad tumoral, en donde el tratamiento de las enfermedades tumorales comprende inhibir el crecimiento y la proliferación tumoral, como se desprenderá del apartado experimental que se proporciona a continuación. Otro aspecto de la presente invención es el uso del medio acondicionado que comprende una pluralidad de proteínas secretadas por células y que se puede obtener cultivando, en un medio líquido de cultivo celular, una célula madre adulta capaz de diferenciarse en una pluralidad de tipos de células diferenciadas, para
- 45 preparar un medicamento para el tratamiento terapéutico de una enfermedad tumoral, caracterizado por que la célula madre adulta capaz de diferenciarse en una pluralidad de tipos de células diferenciadas es una célula madre hepática no ovalada. Se prefiere un medio acondicionado libre de células para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad tumoral.

- 50 Un medio acondicionado libre de células adecuado para su uso en el tratamiento de una enfermedad tumoral de acuerdo con la realización preferida de la invención se puede obtener, por ejemplo, mediante un método que comprende:

- (i) cultivar una célula madre adulta capaz de diferenciarse en una pluralidad de tipos de células diferenciadas como se ha definido anteriormente en un medio líquido de cultivo celular durante un período de tiempo predeterminado; y
(ii) retirar la fracción celular del medio líquido de cultivo celular. Obteniéndose así un medio acondicionado libre de células que comprende una pluralidad de proteínas secretadas por células.

En el apartado experimental de la descripción de la patente, se desvela un medio líquido de cultivo celular adecuado para obtener el medio acondicionado útil para el tratamiento de una enfermedad tumoral.

Sin embargo, se ha de entender que cualquier medio líquido de cultivo celular adecuado para el cultivo de células madre o progenitoras de mamíferos, preferentemente, de células madre o progenitoras humanas, puede usarse para obtener el medio de cultivo celular de acuerdo con la presente invención. Los siguientes medios alternativos se mencionan a modo de ejemplos no limitantes: medio Eagle modificado de Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12), medio del Instituto Roswell Park Memorial (RPMI-1640), Medio mínimo esencial (MEM), Medio Alfa (α -MEM), Medio 199 y medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM).

La selección y el uso de un medio de cultivo adecuado, que puede depender, por ejemplo, del tipo de célula madre usado en particular para producir el medio de cultivo, pertenecen al conocimiento y a las habilidades del experto en la materia.

En una realización preferida, la fracción celular se cultiva durante un período de tiempo predeterminado, luego se retira del medio líquido de cultivo celular mediante centrifugación o filtración. Un período de tiempo predeterminado adecuado está comprendido, por ejemplo, entre 6 y 48 horas, preferentemente, entre 12 y 24 horas. Cualquier medio de cultivo adecuado para el cultivo de células madre/progenitoras adultas animales o humanas, preferentemente, de células de mamífero, en condiciones no diferenciadoras es adecuado para su uso como medio líquido de cultivo de células.

Tras la retirada de la fracción celular, el medio acondicionado libre de células así obtenido se somete opcionalmente a una etapa de purificación adicional, por ejemplo, por ultracentrifugación. La ultracentrifugación se lleva a cabo convenientemente a de aproximadamente 20.000 a 300.000 g, preferentemente a de aproximadamente 80.000 a 200.000 g durante aproximadamente 1 hora a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, por ejemplo, a aproximadamente 4 °C.

Otras etapas de purificación opcionales son la retirada de la fracción de materia que tiene un Peso Molecular Nominal (PMN) inferior a aproximadamente 3 KDa, que se efectúa, por ejemplo, mediante ultrafiltración y/o el tratamiento con RNasa para degradar cualquier ARN libre que pueda estar contenido dentro del medio acondicionado.

La célula madre adulta puede ser una célula madre animal o una célula madre humana. Se prefieren las células madre humanas cuando el tratamiento terapéutico se administra a un paciente humano.

De acuerdo con la invención, la célula madre adulta es una célula madre hepática no ovalada, preferentemente, la célula progenitora pluripotente hepática humana no ovalada (HLSC) desvelada en el documento WO 2006/126236.

El "Ejemplo comparativo" proporcionado en el apartado experimental de la descripción de la patente muestra que tanto el MA de HLSC como el MA de MSC son eficaces para aumentar la apoptosis de las células HepG2, aunque el MA de HLSC es más eficaz que el MA de MSC. El ejemplo comparativo también muestra que ambos medios acondicionados (el MA de HLSC y el MA de MSC) son más eficaces que el TGF- β solo.

A continuación, el medio acondicionado derivado de una célula madre hepática no ovalada, preferentemente la célula progenitora pluripotente hepática humana no ovalada desvelada en el documento WO 2006/126236, se denominará "MA de HLSC". El MA de HLSC está preferentemente libre de células.

En una realización preferida, las HLSC tienen las características resumidas en la Tabla I, página 7 del documento WO2006/126236 (en donde dichas células se designan como "HuHEP"), que ilustra su caracterización mediante FACS y análisis de inmunofluorescencia. Los resultados de dicho análisis se presentan a continuación en el presente documento.

Marcador	Análisis de FACS (% de células positivas: media $\pm$ DT)
CD34	-
CD45	-
CD14	-
CD73	+

Marcador	Análisis de FACS (% de células positivas: media $\pm$ DT)
CD29	+
CD44	+
CD117 (c-Kit)	-
CD90 (Thy-1)	+
CD146	-
CD133	-
CD105 (endoglina)	+
Marcador	Análisis de inmunofluorescencia (% de células positivas: media $\pm$ DT)
α -fetoproteína (AFP)	+
CK18	+
CK19	-
Albúmina (ALB)	+
HLA-A,B,C	+

La composición del MA de HLSC obtenida de la célula progenitora pluripotente hepática humana no ovalada desvelada en el documento WO 2006/126236 se ha caracterizado y desvelado en la solicitud de patente internacional PCT/EP2009/057232. Dichas características se incorporan en el presente documento por referencia.

- 5 A modo de ejemplo, el MA de HLSC libre de células se obtiene cultivando las HLSC desveladas en el documento WO 2006/126236, ya sea en condiciones de BPM, que son conocidas por el experto, o en un sistema BAL (hígado bioartificial), que también es conocido por el experto.

Un ejemplo de las condiciones BPM para el crecimiento de células madre/progenitoras pluripotentes hepáticas y la recolección de su medio acondicionado (MA) libre de células es el siguiente.

- 10 Se aíslan células madre/progenitoras pluripotentes hepáticas mediante el método desvelado en el documento WO2006/126236, en donde la etapa de expansión se lleva a cabo cultivando las células madre progenitoras en presencia de suero de ternera fetal (FCS), preferentemente a una concentración de aproximadamente el 10 %, hEGF (factor de crecimiento epitelial humano) y bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos). FCS, bFGF y hEGF son preferentemente de grado BPM, por ejemplo, los producidos por Invitrogen.

- 15 Para recoger el medio acondicionado en condiciones de BPM, se retira el FCS del cultivo, ya que se trata es una proteína heteróloga que no es adecuada para la inyección en seres humanos. Para ese fin, las células se lavan y se cultivan durante 24 horas en un medio de recogida compuesto, por ejemplo, de alfa-MEM complementado con albúmina humana de grado BPM. La albúmina está preferentemente a una concentración de aproximadamente el 0,05 %. Como alternativa, se puede usar alfa-MEM solo o alfa-MEM complementado con FCS al 2 %. El medio acondicionado libre de células se recoge luego por centrifugación o filtración.

- 20 De acuerdo con una realización de la invención, la enfermedad tumoral es un tumor sólido. Preferentemente, la enfermedad tumoral se selecciona de entre el grupo que comprende tumor hepático, tumor epitelial, tumor de mama, tumor de pulmón, tumor de próstata, tumor gástrico y tumor de colon. Más preferentemente, la enfermedad tumoral es hepatoma, sarcoma de Kaposi o adenocarcinoma de mama.

- 25 El medio acondicionado libre de células se usa tal cual o en forma concentrada. Una forma concentrada está concentrada, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 veces, preferentemente, al menos aproximadamente 10 veces, más preferentemente, al menos aproximadamente 20 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 25 veces. El medio acondicionado sin células se administra local o sistémicamente. Una forma farmacéutica adecuada para la administración local y sistémica es una forma farmacéutica inyectable. A modo de ejemplo, el MA libre de células se puede administrar mediante inyección local intratumoral (i.t.) cuando el tumor es
30 sólido, o mediante inyección intravenosa en caso de metástasis.

Otros objetos y ventajas de la invención se desprenderán con mayor claridad de el siguiente apartado experimental, que se proporciona únicamente a modo ilustrativo. En el apartado experimental, se hace referencia a las siguientes figuras:

- 35 La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de proliferación *in vitro* realizados incubando células HepG2 con diferentes dosis de MA de HLSC concentrado 25 veces durante 48 horas. La proliferación de HepG2 se evaluó mediante el ensayo de incorporación de BrdU tras 48 horas de incubación. Se cultivaron HepG2 solo en DMEM o en DMEM complementado con 0,5; 2; 8 o 16 % de MA concentrados 25 veces. Tras 48 horas, se cuantificó la proliferación de las células HepG2 usando el ensayo de incorporación de BrdU. Los experimentos se

realizaron por cuadruplicado. Los datos mostrados son la media $\pm$ desviación típica de ocho experimentos. $p < 0,05$.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de proliferación *in vitro* llevados a cabo incubando células HepG2 con diferentes dosis de MA de HLSC concentrado 25 veces durante 4 días. La proliferación de HepG2 se evaluó mediante el ensayo de incorporación de BrdU tras 4 días de incubación. Se cultivaron HepG2 solo en DMEM o en DMEM complementado con 1; 8 o 16 % de MA de HLSC concentrado 25 veces durante 4 días. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado. Los datos mostrados son la media $\pm$ desviación típica de ocho experimentos. $p < 0,05$.

La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de proliferación *in vitro* llevados a cabo incubando células HepG2, MCF-7 y Kaposi (KS) con dos preparados diferentes de MA de HLSC concentrado 25 veces. La proliferación de células HepG2, MCF-7 y Kaposi (KS) se evaluó mediante el ensayo de incorporación de BrdU tras 48 horas de incubación con 16 % de MA concentrado 25 veces derivado de HLSC6b y de HLSC2. Los experimentos se realizaron por duplicado. Los datos mostrados son la media $\pm$ desviación típica de cuatro experimentos. $p < 0,05$.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de apoptosis *in vitro* llevados a cabo incubando células HepG2 con MA de HLSC concentrado 25 veces. La apoptosis de HepG2 se evaluó mediante el ensayo TUNEL como el porcentaje de células apoptóticas tras 24 horas de incubación con diferentes dosis de MA (0,5; 1; 2; 6; y 16 % de MA concentrado 25 veces). Se usaron vincristina y doxorubicina como control positivo de la inducción de la apoptosis; en el control negativo, las HepG2 se trataron solo con vehículo. Los resultados se expresan como la media $\pm$ DT de 3 experimentos diferentes.

La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de apoptosis *in vitro* realizados incubando células HepG2, MCF-7 y KS con MA de HLSC concentrado 25 veces. La apoptosis de las células HepG2, MCF-7 y KS se evaluó mediante el ensayo TUNEL como el porcentaje de células apoptóticas tras 72 horas de incubación con 16 % de MA concentrado 25 veces derivado de dos preparados celulares diferentes (HLSC-6B y HLSC-2). Se usó vincristina como control positivo de la inducción de la apoptosis; en el control negativo, las células se trataron solo con vehículo. Los resultados se expresan como la media $\pm$ DT de 3 experimentos diferentes. $p < 0,05$.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la actividad antitumoral de MA de HLSC administrado en ratones SCID trasplantados con HepG2. Se determinó el volumen tumoral midiendo con un calibrador dos diámetros perpendiculares del implante cada semana.

La Figura 7 es un gráfico que muestra los datos obtenidos midiendo el volumen tumoral de los tumores de HepG2 recuperados después del tratamiento i.t. con MA de HLSC ($n = 6$) o vehículo ($n = 6$) en el momento del sacrificio de los ratones. Se determinó el volumen tumoral midiendo con un calibrador dos diámetros perpendiculares del implante cada semana.

La Figura 8 es un gráfico que muestra los datos obtenidos midiendo el peso tumoral de los tumores de HepG2 recuperados después del tratamiento i.t. con MA de HLSC ($n = 6$) o vehículo ($n = 6$) en el momento del sacrificio de los ratones.

La Figura 9 son micrografías que muestran la inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral mediante el tratamiento con MA de HLSC y la apoptosis intratumoral inducida (A). Micrografías representativas de tumores de HepG2 recuperados tras 4 semanas, de ratones tratados con MA y no tratados. B) Tinción con hematoxilina y eosina y PCNA (C) de tumores de HepG2 tratados con MA o no tratados. D) Micrografías representativas que muestran la apoptosis de tumores de HepG2 recuperados tratados solo con vehículo o tumores de HepG2 tratados con MA de HLSC.

APARTADO EXPERIMENTAL

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se cultivó una estirpe celular de hepatoma humana, HepG2, en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina a 100 $\mu\text{g/ml}$ y estreptomycin a 100 $\mu\text{g/ml}$, y se mantuvo en una incubadora con una atmósfera humidificada de CO_2 al 5 % a 37 °C.

Se cultivaron células madre hepáticas humanas (HLSC) en α -MEM/EBM (3:1), complementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina a 100 $\mu\text{g/ml}$ y estreptomycin a 100 $\mu\text{g/ml}$. El EBM se reconstituyó con hEGF (factor de crecimiento epitelial humano), Hidrocortisona, GA (gentamicina), BBE (extracto de cerebro bovino).

Se obtuvieron estirpes celulares de adenocarcinoma de mama MCF-7 de la colección americana de cultivos tipo (Manassas, VA), y se cultivaron en DMEM complementado con FCS al 10 %, penicilina a 100 $\mu\text{g/ml}$ y estreptomycin a 100 $\mu\text{g/ml}$, y se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera humidificada de CO_2 al 5 % a 37 °C.

Se obtuvo un cultivo primario de células de sarcoma de Kaposi (células KS) de una lesión cutánea de un paciente con aloinjerto renal bajo terapia inmunosupresora, y se cultivó en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 10 %, penicilina a 100 µg/ml y estreptomycin a 100 µg/ml.

Purificación del medio acondicionado (MA) a partir de células HLSC

- 5 Se preparó el medio acondicionado (MA) libre de células de HLSC recogiendo el medio de cultivo celular mediante centrifugación tras 24 horas de cultivo. Los experimentos se realizaron con una masa celular de 2×10^6 células. El medio se ultracentrifugó y se concentró, a aproximadamente 25 veces, por centrifugación a 2700 g durante 75 minutos, con unidades de ultrafiltración (Amicon Ultra-PL 3) que tenían un límite de peso molecular de 3 kDa. Se obtuvo un volumen total de 250 µl de medio acondicionado concentrado. La concentración de proteína del MA concentrado usada para los experimentos *in vitro* fue MA = 4,8 mg/ml. En experimentos seleccionados, el MA libre de células se trató con 1 U/ml de RNasa durante 1 hora a 37 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 10 U/ml de inhibidor de RNasa.

Análisis de la composición del MA mediante matriz de anticuerpos basada en marcadores de biotina Raybio

- 15 Se detectaron simultáneamente los niveles de expresión de 507 proteínas diana humanas derivadas de MA de HLSC. El MA se recogió tras 48 horas de cultivo de 1×10^6 células en presencia de α MEM complementado con FCS al 0,2 % como se describe en el protocolo de las matrices de proteínas. El panel de moléculas incluía citocinas, quimiocinas, adipocinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos, proteasas, receptores solubles, moléculas de adhesión solubles y otras proteínas del sobrenadante del cultivo celular.

- 20 Para preparar el MA de HLSC, las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 100 mm a una densidad de 1×10^6 células por placa. Luego, las células se cultivaron con medio de cultivo completo durante 24-48 horas. Tras ello, se reemplazó el medio con suero inferior (FCS al 0,2 %) y luego se volvieron a cultivar las células durante 48 horas de nuevo. El MA se recogió y se centrifugó a 1000 g. El MA se sometió a diálisis antes del paso de marcaje con biotina. Mediante un proceso sencillo, se biotiniló la amina primaria de las proteínas de las muestras, seguido de la diálisis para retirar la biotina libre. A partir de ese momento, se añadieron las muestras recién biotiniladas a la membrana de la matriz y se incubaron a temperatura ambiente. Tras la incubación con HRP-estreptavidina, las señales se visualizaron por quimioluminiscencia. En esta matriz, se utilizó un control interno para controlar todo el proceso, incluyendo el marcador de biotina y la matriz de anticuerpos. Los resultados se analizaron con RayBio Analysis Tool, que es un programa diseñado específicamente para el análisis de matrices de anticuerpos basadas en marcadores de biotina RayBio. Se pueden encontrar más detalles sobre este ensayo en el manual de usuario I de la matriz de anticuerpos humanos basada en marcadores de biotina RayBio®.

Los resultados completos del ensayo de la matriz de anticuerpos basada en marcadores de biotina RayBio se resumen en la siguiente tabla.

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MS
6Ckine	6,11	2,06
Activina A	6,54	2,16
Activina B	5,42	2,18
Activina C	7,27	2,56
Activina RIA/ALK-2	5,63	2,18
Activina RIB/ALK-4	5,27	1,95
Activina RII A/B	5,18	1,76
Activina RIIA	5,28	1,71
Adiponectina/Acrp30	5,57	1,48
AgRP	5,67	1,59
ALCAM	10,30	2,62
Angiogenina	9,40	2,38
Angiopoyetina-1	6,45	1,45
Angiopoyetina-2	5,92	1,48
Angiopoyetina-4	5,62	1,40
Angiopoyetina tipo-1	5,76	1,36
Angiopoyetina tipo-2	6,51	1,51
Factor de tipo angiopoyetina	6,26	1,53
Angiostatina	6,90	1,66

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MSK
APJ	6,00	1,40
AR (Anfiregulina)	6,34	1,47
APRIL	7,03	1,47
Artemina	7,30	1,52
Ax1	8,83	1,70
B7-1/CD80	9,33	1,66
BAFF R/TNFRSF13C	9,12	1,48
BCMA/TNFRSF17	4,68	1,79
BD-1	4,64	1,77
BDNF	4,71	1,68
beta-Catenina	4,23	1,61
beta-Defensina 2	4,31	1,63
beta-NGF	4,38	1,66
BIK	4,56	1,73
BLC/BCA-1/CXCL13	4,36	1,56
BMP-2	4,25	1,50
BMP-3	4,43	1,43
BMP-3b/GDF-10	4,34	1,43
BMP-4	4,60	1,41
BMP-5	4,46	1,40
BMP-6	4,47	1,34
BMP-7	4,44	1,31
BMP-8	4,87	1,31
BMP-15	4,74	1,33
BMPR-IA/ALK-3	5,30	1,49
BMPR-IB/ALK-6	6,35	1,69
BMPR-II	5,76	1,59
BTC	5,71	1,61
Cardiotrofina-1/CT-1	5,89	1,61
CCL14/HCC-1/HCC-3	5,92	1,50
CCL28/VIC	6,67	1,57
CCR1	7,76	1,42
CCR2	9,00	1,63
CCR3	8,21	1,49
CCR4	8,04	3,02
CCR5	5,02	1,97
CCR6	5,59	2,08
CCR7	5,52	1,89
CCR8	4,43	1,51
CCR9	4,10	1,48
CD14	4,21	1,55
CD27/TNFRSF7	3,94	1,50
CD30/TNFRSF8	3,70	1,38
Ligando CD30/TNFSF8	4,28	1,40
CD40/TNFRSF5	4,40	1,56
Ligando CD40/TNFSF5/CD154	4,14	1,38
CD 163	3,69	1,33
Cerberus 1	3,86	1,29
Chem R23	3,59	1,22
Cordina-tipo 1	3,62	1,14

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MSK
Cordina-tipo 2	3,74	1,16
Csk	5,97	1,51
CLC	4,23	1,20
CNTF	4,73	1,35
CNTF R alfa	4,51	1,29
Factor de coagulación III/Factor tisular	4,70	1,38
CRIM 1	8,98	2,55
Cripto-1	5,26	1,50
CRTH-2	5,11	1,44
Cryptic	5,65	1,59
CTACK/CCL27	6,33	1,66
CTGF/CCN2	6,97	1,77
CTLA-4/CD152	10,38	2,31
CV-2/Crossveinless-2	7,80	1,61
CXCL14/BRAK	6,49	2,03
CXCL16	4,64	1,67
CXCR1/IL-8 RA	4,56	1,61
CXCR2/IL-8 RB	4,41	1,55
CXCR3	4,01	1,56
CXCR4 (fusina)	3,85	1,44
CXCR5/BLR-1	3,84	1,41
CXCR6	3,92	1,40
D6	3,77	1,38
DAN	4,02	1,36
DANCE	3,78	1,38
DcR3/TNFRSF6B	3,62	1,28
Decorina	9,12	2,86
Dkk-1	4,35	1,36
Dkk-3	3,41	1,12
Dkk-4	3,50	1,09
DR3/TNFRSF25	3,53	1,11
DR6/TNFRSF21	4,20	1,25
Dtk	9,06	2,17
EDA-A2	237,46	2,94
EDAR	6,79	1,88
EDG-1	4,43	1,25
EGF	4,63	1,30
EGFR/ErbB1	4,69	1,31
EG-VEGF/PK1	5,03	1,34
EMAP-II	6,15	1,75
ENA-78	6,28	1,74
Endocan	8,34	2,14
Endoglin/CD105	8,97	2,02
Endostatina	8,59	1,53
EN-RAGE	5,09	2,04
Eotaxina/CCL11	4,52	1,77
Eotaxina-2/MPIF-2	4,27	1,47
Eotaxina-3/CCL26	4,24	1,52
Epirregulina	3,87	1,43
ErbB2	3,90	1,43

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MSK
ErbB3	4,17	1,56
ErbB4	3,82	1,34
Eritropoyetina	4,16	1,26
E-selectina	3,79	1,33
Endotelina	14,95	3,86
FADD	3,77	1,29
FAM3B	6,05	1,76
Fas/TNFRSF6	3,73	1,21
Ligando de Fas	3,61	1,11
FGF básico	3,67	1,08
FGF-BP	3,78	1,16
FGF R3	4,05	1,19
FGF R4	4,72	1,29
FGF R5	17,21	2,92
FGF-4	4,68	1,30
FGF-5	4,05	1,13
FGF-6	4,27	1,16
FGF-7/KGF	4,93	1,22
FGF-8	4,89	1,37
FGF-9	5,40	1,49
FGF-10/KGF-2	5,74	1,56
FGF-11	6,19	1,66
FGF-12	8,68	1,98
FGF-13 1B	7,74	1,60
FGF-16	5,31	1,77
FGF-17	3,91	1,37
FGF-18	4,00	1,44
FGF-19	3,88	1,37
FGF-20	3,67	1,33
FGF-21	3,88	1,42
FGF-23	3,90	1,22
FLRG	3,84	1,34
Ligando Flt-3	3,69	1,32
Folistatina	5,33	1,58
Follistatina-tipo 1	5,81	1,15
Fractalkina	3,94	1,28
Frizzled-1	3,88	1,23
Frizzled-3	3,80	1,18
Frizzled-4	3,78	1,21
Frizzled-5	4,52	1,36
Frizzled-6	5,46	1,62
Frizzled-7	4,17	1,23
Galectina-3	5,86	1,56
GASP-1/WFIKKRNP	5,03	1,44
GASP-2/WFIKKRNP	4,39	1,20
GCP-2/CXCL6	4,69	1,26
GCSF	5,57	1,52
G-CSF R/CD 114	4,68	1,26
GDF1	5,00	1,28
GDF3	6,38	1,77

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MSK
GDF5	6,55	1,74
GDF8	6,08	1,58
GDF9	10,31	2,25
GDF11	8,84	1,70
GDF-15	4,64	1,34
GNDF	3,87	1,27
GFR alfa-1	3,67	1,25
GFR alfa-2	3,92	1,21
GFR alfa-3	4,09	1,39
GFR alfa-4	4,01	1,45
GITR/TNFRF18	3,80	1,33
Ligando de GITR/TNFSF18	4,04	1,44
Glucagón	3,89	1,31
Glut1	3,61	1,23
Glut2	3,73	1,22
Glut3	3,87	1,25
Glut5	4,00	1,29
Glipicano 3	34,34	2,73
Glipicano 5	5,27	1,48
GM-CSF	4,20	1,24
GM-CSF R alfa	4,37	1,28
Granzyma A	4,92	1,41
GREMLIN	8,49	2,19
GRO	21,75	3,69
GRO-a	4,90	1,32
Hormona de crecimiento (GH)	5,17	1,34
Hormona de crecimiento R (GHR)	5,42	1,36
HB-EGF	5,37	1,46
HCC-4/CCL16	4,91	1,33
HCR/CRAM-A/B	5,09	1,39
Hepasocina	6,08	1,61
Heregulina/NDF/GGF/Neuregulina	6,08	1,45
HGF	15,29	3,38
HGFR	6,53	1,31
HRG-alfa	4,47	1,40
HRG-beta 1	4,09	1,25
HVEM/TNFRSF14	4,06	1,24
I-309	3,67	1,25
ICAM-1	3,49	1,25
ICAM-2	3,28	1,16
ICAM-3 (CD50)	3,77	1,15
ICAM-5	3,49	1,24
IFN-alfa/ beta R1	3,50	1,19
IFN-alfa/ beta R2	3,52	1,18
IFN-beta	3,66	1,19
IFN-gamma	3,67	1,17
IFN-gamma R1	3,89	1,22
IGFBP-1	4,95	1,39
IGFBP-2	13,69	2,11
IGFBP-3	6,11	1,66

ES 2 752 348 T3

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MS
IGFBP-4	5,90	1,64
IGFBP-6	27,78	4,59
IGFBP-rp1/IGFBP-7	333,01	2,75
IGF-I	13,74	3,15
IGF-I SR	5,23	1,35
IGF-II	4,76	1,26
IGF-II R	6,57	1,69
IL-1 alfa	9,12	2,26
IL-1 beta	4,87	1,30
IL-1 F5/FIL1 delta	5,25	1,42
IL-1 F6/FIL1 épsilon	7,50	1,79
IL-1 F7/FIL1 zeta	5,73	1,37
IL-1 F8/FIL1 eta	5,91	1,25
IL-1 F9/IL-1 H1	6,37	1,24
IL-1 F10/IL-1HY2	4,26	1,19
IL-1 R3/IL-1 R AcP	4,11	1,25
IL-1 R4 /ST2	4,29	1,33
IL-1 R6/IL-1 Rrp2	3,69	1,21
IL-1 R8	3,32	1,13
IL-1 R9	3,32	1,07
IL-1 ra	3,36	1,11
IL-1 sRI	3,29	1,09
IL-1 sRII	3,25	1,03
IL-2	3,53	1,12
IL-2 R alfa	4,82	1,43
IL-2 R beta/CD122	3,88	1,15
IL-2 R gamma	4,07	1,17
IL-3	4,34	1,26
IL-3 R alfa	4,64	1,24
IL-4	4,72	1,25
IL-4R	5,53	1,11
IL-5	6,31	1,60
IL-5 R alfa	16,15	2,21
IL-6	35,23	1,46
IL-6 R	6,41	1,51
IL-7	6,01	1,51
IL-7 R alfa	6,10	1,30
IL-8	38,69	1,37
IL-9	6,41	1,47
IL-10	5,27	1,39
IL-10 R alfa	5,42	1,36
IL-10 R beta	5,54	1,38
IL-11	5,71	1,20
IL-12 p40	6,30	1,17
IL-12 p70	4,14	1,22
IL-12 R beta 1	3,44	1,08
IL-12 R beta 2	8,52	1,70
IL-13	3,81	1,11
IL-13 R alfa 1	4,12	1,14
IL-13 R alfa 2	3,59	1,03

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MS
IL-15	4,07	1,19
IL-15 R alfa	4,37	1,19
IL-16	4,16	1,17
IL-17	4,13	1,18
IL-17B	4,59	1,17
IL-17B R	4,89	1,16
IL-17C	5,24	1,23
IL-17D	5,18	1,24
IL-17E	5,74	1,41
IL-17F	5,96	1,40
IL-17R	5,29	1,35
IL-17RC	9,68	2,10
IL-17RD	6,54	1,60
IL-18 BPa	7,23	1,50
IL-18 R alfa/IL-1 R5	5,76	1,44
IL-18 R beta /AcPL	5,84	1,44
IL-19	6,69	1,61
IL-20	6,79	1,58
IL-20 R alfa	15,60	3,16
IL-20 R beta	7,48	1,34
IL-21	3,14	0,98
IL-21 R	3,18	0,95
IL-22	3,34	0,91
IL-22 BP	3,22	0,93
IL-22 R	3,51	0,97
IL-23	4,14	1,07
IL-23 R	3,75	1,06
IL-24	4,14	1,07
IL-26	4,28	1,17
IL-27	5,71	1,42
IL-28A	9,23	2,20
IL-29	5,31	1,18
IL-31	4,89	1,23
IL-31 RA	5,80	1,26
Inhibina A	5,19	1,31
Inhibina B	5,93	1,37
Insulina	5,29	1,25
Insulina R	5,13	1,22
Insulinina/IDE	7,60	1,78
IP-10	5,86	1,36
I-TAC/CXCL11	5,83	1,40
Kininostatina/kininogen	7,18	1,75
Kremen-1	6,35	1,54
Kremen-2	13,18	3,01
Lck	7,05	1,42
TGF-beta bp1 latente	28,04	4,90
LBP	4,34	1,23
LECT2	3,38	1,00
Lefty - A	3,38	1,01
Leptina R	3,66	0,98

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MS
Leptina (OB)	3,52	1,03
LFA-1 alfa	3,75	1,05
LIF	4,12	1,09
LIF R alfa	4,43	1,02
LIGHT/TNFSF14	4,34	1,09
Lipocalina-1	4,58	1,14
LRP-1	9,89	1,81
LRP-6	29,80	2,28
L-Selectina (CD62L)	5,94	1,51
Luciferasa	5,29	1,25
Linfotactina/XCL1	8,21	1,50
Linfotoxina beta/TNFSF3	5,97	1,39
Linfotoxina beta R/TNFRSF3	5,61	1,30
MAC-1	5,54	1,20
MCP-1	22,87	1,84
MCP-2	5,83	1,37
MCP-3	6,96	1,65
MCP-4/CCL13	6,09	1,48
M-CSF	6,90	1,65
M-CSF R	7,02	1,62
MDC	8,30	1,64
MFG-E8	8,93	1,62
MFRP	3,43	0,98
MIF	3,73	1,02
MIG	3,67	1,03
MIP-1a	5,17	1,42
MIP-1b	3,49	0,98
MIP-1d	3,45	0,93
MIP 2	11,45	2,56
MIP-3 alfa	4,64	1,33
MIP-3 beta	3,68	1,03
MMP-1	5,06	1,20
MMP-2	4,30	1,14
MMP-3	4,08	0,75
MMP-7	4,49	0,93
MMP-8	4,80	1,15
MMP-9	4,25	0,98
MMP-10	6,05	1,44
MMP-11 /Estromelisina-3	5,23	1,22
MMP-12	5,12	1,33
MMP-13	5,75	1,40
MMP-14	7,60	1,79
MMP-15	5,71	1,39
MMP-16/MT3-MMP	7,86	1,80
MMP-19	9,10	1,70
MMP-20	8,06	1,68
MMP-24/MT5-MMP	6,44	1,48
MMP-25/MT6-MMP	6,20	1,36
Musk	6,62	1,41
Cadena de MSP alfa	6,85	1,40

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MSK
Cadena de MSP beta	16,76	2,65
NAP-2	9,61	1,71
NCAM-1/CD56	5,11	1,24
Neuritina	4,04	1,06
NeuroD1	3,86	1,07
Neuropilina-2	3,58	1,01
Neurturina	3,58	0,94
NGF R	3,63	1,03
NOV/CCN3	3,58	1,13
Isoforma GGF2 de NRG1	3,60	1,10
NRG1-alfa/HRG1-alfa	3,58	1,03
NRG1-beta1/HRG1-beta1	4,12	1,20
NRG2	4,09	1,02
NRG3	4,45	1,11
NT-3	3,73	0,96
NT-4	4,10	0,85
Orexina A	4,34	0,65
Orexina B	4,60	0,55
OSM	4,89	0,69
Osteoactivina/GPNMB	5,20	0,98
Osteocrina	8,16	1,73
Osteoprotegerina/TNFRSF11B	265,56	5,65
Ligando OX40/TNFSF4	11,27	2,49
PARC/CCL18	5,35	1,26
PD-ECGF	5,31	1,20
PDGF R alfa	5,73	1,32
PDGF R beta	6,80	1,49
PDGF-AA	7,08	1,54
PDGF-AB	6,91	1,52
PDGF-BB	7,03	1,51
PDGF-C	7,12	1,43
PDGF-D	7,08	1,31
PECAM-1/CD31	4,21	1,18
Pentraxin3/TSG-14	11,67	2,24
Persefina	4,49	1,20
PF4/CXCL4	3,88	1,10
P1GF	3,69	1,10
PLUNC	3,72	1,17
Pref-1	3,88	1,20
Progranulina	4,96	1,52
Prolactina	4,16	1,26
P-selectina	3,86	1,10
RAGE	3,93	1,06
RANK /TNFRSF11A	4,43	1,17
RANTES	3,86	1,05
RELM beta	3,74	0,98
RELT/TNFRSF19L	4,28	0,93
ROBO4	4,21	1,08
S100 A8/A9	4,84	1,18
S100A10	4,89	1,19

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MSK
SAA	5,14	1,23
SCF	7,37	1,53
SCF R/CD117	5,51	1,32
SDF-1/CXCL12	5,32	1,18
sFRP-1	6,65	1,47
sFRP-3	6,42	1,35
sFRP-4	69,46	5,43
sgp130	15,48	2,93
SIGIRR	7,82	1,55
Siglec-5/CD170	7,13	1,47
Siglec-9	7,91	1,63
SLPI	7,96	1,29
Smad 1	4,78	1,23
Smad 4	10,65	2,26
Smad 5	4,59	1,15
Smad 7	4,59	1,22
Smad 8	3,92	1,09
Isoforma SMDF/NGR1	4,11	1,05
Soggy-1	3,92	1,14
Sonic Hedgehog (Shh N-terminal)	3,77	1,10
SPARC	56,56	3,63
Espinesina	6,40	1,68
TACI/TNFRSF13B	4,40	1,10
Tarc	3,85	1,07
TCCR/WSX-1	3,80	1,00
TECK/CCL25	3,79	0,98
TFPI	5,18	1,22
TGF-alfa	4,28	1,09
TGF-beta 1	4,64	1,19
TGF-beta 2	4,85	1,22
TGF-beta 3	5,26	1,32
TGF-beta 5	5,28	1,29
TGF-beta RI/ALK-5	6,94	1,51
TGF-beta RII	5,43	1,30
TGF-beta RIIB	5,72	1,34
TGF-beta RIII	6,70	1,53
Trombopoyetina (TPO)	7,40	0,94
Trombospondina (TSP)	325,53	3,99
Trombospondina-1	281,16	3,76
Trombospondina-2	10,81	1,94
Trombospondina-4	7,96	1,57
Timopoyetina	7,60	1,44
Tie-1	4,03	0,88
Tie-2	3,92	0,86
TIMP-1	137,73	1,08
TIMP-2	54,09	7,91
TIMP-3	7,21	1,73
TIMP-4	4,31	1,05
TL1A/TNFSF15	4,70	1,14
TLR1	4,81	1,21

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	Proporción de HLSC/MS
TLR2	5,77	1,36
TLR3	4,47	1,06
TLR4	4,16	1,01
TMEFF1/Tomoregulina-1	4,91	1,10
TMEFF2	4,66	1,16
TNF-alfa	5,07	1,26
TNF-beta	5,36	1,26
TNF RI/TNFRSF1A	8,08	1,77
TNF RII/TNFRSF1B	5,79	1,19
TRADD	5,70	1,26
TRAIL/TNFSF10	5,83	1,26
TRAIL R1/DR4/TNFRSF10A	6,28	1,40
TRAIL R2/DR5/TNFRSF10B	6,57	1,36
TRAIL R3/TNFRSF10C	6,98	1,44
TRAIL R4/TNFRSF10D	8,02	1,38
TRANCE	9,17	1,53
TREM-1	4,77	0,95
TROY/TNFRSF19	5,21	1,04
TSG-6	5,72	1,10
TSLP	4,90	1,03
TWEAK/TNFSF12	5,00	1,03
TWEAK R/TNFRSF 12	5,14	1,07
Ubiquitina+1	4,92	1,03
uPA	4,94	0,90
uPAR	5,41	1,11
Vasorina	6,12	1,27
VCAM-1 (CD106)	5,02	1,11
VE-Cadherina	5,20	1,18
VEGF	10,00	1,61
VEGF R2 (KDR)	5,73	1,25
VEGF R3	5,48	1,19
VEGF-B	5,24	1,15
VEGF-C	7,98	1,60
VEGF-D	6,11	1,18
VEGI/TNFSF15	6,03	1,20
WIF-1	6,07	1,21
WISP-1/CCN4	6,68	1,30
XEDAR	7,81	1,46

Experimentos de cultivo conjunto de HLSC y HepG2

Para investigar si las HLSC son capaces de revertir el fenotipo agresivo de las células cancerosas, se cultivó la estirpe celular hepatocelular HepG2 junto con HLSC en cámaras de transpocillos. Al final de los experimentos, se evaluó la proliferación de HepG2. El compartimento inferior se sembró con HepG2 ($2,5 \times 10^4$ células). El compartimento superior se sembró con HLSC (1×10^5). El cultivo conjunto se mantuvo durante 4 días. Tras 4 días, se retiró el medio y se fijaron las HepG2 en formalina al 10 % y se tiñeron con H&E.

Proliferación celular

Se sembraron HepG2 a 8.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en DMEM (Sigma) privado de FCS usando diferentes concentraciones de MA. Para investigar si el MA derivado de las HLSC también ejerció su actividad antitumoral en estirpes celulares de diferentes tumores, se usaron células de adenocarcinoma de mama MCF-7 y células de sarcoma de Kaposi, y se compararon los efectos antitumorales con los observados en HepG2. La síntesis

de ADN se detectó como la incorporación de 5-bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU) en el ADN celular tras 48 horas de cultivo. Las células se fijaron luego con etanol/HCl 0,5 M y se incubaron con nucleasa para digerir el ADN. La BrdU incorporada en el ADN se detectó con un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa anti-BrdU (mAb) y se visualizó con un sustrato cromogénico soluble. La densidad óptica se midió con un lector ELISA a 405 nm.

5 Ensayo de apoptosis

Se sembraron células HepG2, MCF-7 y KS a 8.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en DMEM bajo en glucosa (Sigma) con FCS al 10 % y en presencia de doxorubicina (100 ng/ml, Sigma) o vincristina (50 ng/ml, Sigma) o diferentes concentraciones de MA (0,5; 1; 2; 8; 16 % de MA concentrado 25 veces). La apoptosis se evaluó con el ensayo TUNEL (ApopTag Oncor, Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

10 Diseño experimental *in vivo*

Se adquirieron ratones SCID macho de 4 a 5 semanas de vida de Charles River Laboratories. Todos los ratones fueron alojados en una instalación limpia y mantenidos durante 1 semana para que se aclimataran. El día 0, se administraron dos inyecciones de 3×10^6 células tumorales HepG2 resuspendidas en DMEM libre de suero con matriz de membrana basal Matrigel a una proporción 1:1. Las HepG2 se inyectaron en un volumen total de 0,2 ml en el área inguinal izquierda y derecha de ratones SCID. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos de tratamiento: el grupo de prueba, que recibió inyecciones de 20 µl de MA concentrado 25 veces por vía intratumoral (i.t.) ($n = 3$), y el grupo de control, que recibió inyecciones de 20 µl de PBS ($n = 3$). Los tumores se hicieron palpables a partir del día 10. El tratamiento con MA comenzó 10 días después del trasplante del tumor con tres inyecciones i.t. posteriores. Se administró un total de 3 inyecciones de 20 µl de MA a cada tumor desarrollado. El tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron el volumen de aproximadamente 15 mm³. Los animales fueron controlados en cuanto a su actividad y estado físico todos los días, y se efectuaron la determinación del peso corporal y la medición del volumen del tumor en cada tratamiento.

Los tumores se midieron con calibradores. El volumen del tumor se determinó midiendo dos diámetros perpendiculares de los tumores implantados y se calculó usando la fórmula $1/2a \times b^2$, en donde a es el diámetro largo y b es el diámetro corto.

Estudios morfológicos

Se fijaron los tumores en formalina neutra tamponada al 10 %, se procesaron de la manera habitual, se embebieron en parafina, se realizaron cortes de 5 µm y se tiñeron con H&E para el examen microscópico. La inmunohistoquímica para la detección de la proliferación se realizó usando el anticuerpo monoclonal anti-PCNA. Los cortes se bloquearon y se marcaron con anticuerpo secundario anti-HRP de ratón (dilución 1:300). La omisión de los anticuerpos primarios o la sustitución con IgG de ratón no inmune se usó como control. La apoptosis en los cortes tumorales embebidos en parafina se evaluó mediante TUNEL. Se contaron diez cortes no consecutivos para células tumorales apoptóticas positivas con un aumento de 630 veces. Se añadió el colorante Hoechst 33258 para la tinción nuclear.

Análisis estadístico

Todos los datos de diferentes procedimientos experimentales se expresan como la media + DT. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA con la prueba de comparación múltiple de Newmann-Keuls cuando fue apropiado.

RESULTADOS

EFFECTO BIOLÓGICO *IN VITRO* DEL MA de HLSC SOBRE LAS CÉLULAS TUMORALES

El MA derivado de HLSC inhibe la proliferación *in vitro* de células HepG2

La actividad antitumoral de MA, derivado de HLSC humanas, se evaluó *in vitro* midiendo su capacidad para inhibir la proliferación de la estirpe celular HepG2.

La incubación de HepG2 con diferentes dosis de MA durante 48 horas (Figura 1) y 4 días (Figura 2), inhibe significativamente la proliferación en comparación con las células de control incubadas solo con vehículo.

El MA derivado de HLSC inhibe la proliferación *in vitro* de células MCF-7 y KS

Con el fin de investigar si los efectos antitumorales de las células madre residentes en el tejido fueron específicos de los tumores originados en el mismo tejido, se evaluó el efecto del MA de HLSC en células cancerosas de tumores de órganos no relacionados, tales como el adenocarcinoma de mama y el sarcoma de Kaposi. La incubación durante

48 horas de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 y de células de sarcoma de Kaposi con 16 % de MA (Figura 3) derivado de dos preparados diferentes de HLSC (HLSC-6B y HLSC-2) inhibe significativamente la proliferación en comparación con las células control incubadas solo con vehículo.

El MA derivado de HLSC indujo la apoptosis *in vitro* de células HepG2

- 5 La incubación de HepG2 con MA de HLSC durante 24 horas, Potenció significativamente la apoptosis en comparación con el control incubado solo con vehículo y en comparación con la estimulación de doxorubicina o vincristina (moléculas apoptóticas; consideradas controles positivos) (Figura 4).

El MA derivado de HLSC potenció la apoptosis *in vitro* de células MCF-7 y KS

- 10 La incubación de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 y de células de sarcoma de Kaposi durante 48 horas con 16 % de MA (Figura 5) derivado de HLSC-6B indujo una apoptosis significativa, en comparación con las células de control incubadas solo con vehículo, con efectos similares a los de la vincristina, un fármaco quimioterapéutico.

EFFECTO BIOLÓGICO *IN VIVO* DEL MA SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TUMOR DE HEPG2

RESULTADOS

- 15 El crecimiento y la proliferación del tumor fueron inhibidos por la forma de MA derivado de HLSC en el modelo de xenoinjerto de hepatoma en ratones SCID

Para determinar el efecto del MA derivado de las HLSC sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, se trasplantó por vía subcutánea en ratones SCID la estirpe celular de hepatocarcinoma humano HepG2. Diez días después de la inyección de HepG2, cuando el volumen de los tumores era de aproximadamente 15 mm³, los ratones fueron tratados con inyección intratumoral de MA, para un máximo de 20 µl de volumen. En los ratones de control, los tumores fueron inyectados con 20 µl de PBS. Tras diez días de la inyección de HepG2, se extrajeron todos los tumores y se analizaron. En este modelo de xenoinjerto, la inyección intratumoral de MA (Figura 6; Figura 9, Panel A) mostró un efecto de inhibición sobre el crecimiento tumoral. Además, el análisis histológico mostró áreas de necrosis en los tumores tratados con MA (Figura 9, Panel B) y se observó un efecto antiproliferativo usando tinción con PCNA (Figura 9, Panel C). Para determinar el efecto del MA en la apoptosis intratumoral, se analizaron cortes de parafina de tumores tratados con MA mediante TUNEL. Los tratamientos con el MA indujeron la apoptosis (Figura 9, Panel B), en comparación con los tumores tratados solo con vehículo (Figura 9, Panel D). En el momento del sacrificio, se midieron el volumen del tumor (Figura 7) y el peso del tumor (Figura 8).

Se sabe que la vía de señalización de Wnt/β-catenina participa en la embriogénesis y en la carcinogénesis. Los estudios clínicos han informado que la activación anormal de la vía de Wnt/β-catenina, con frecuencia, tiene que ver con la hepatocarcinogénesis. Se ha informado que el ligando Wnt-1 se expresa de manera anómala en una variedad de cánceres humanos, incluyendo el HCC.

Sin quedar ligados a teoría alguna, los presentes inventores plantean la hipótesis de que uno de los mecanismos posiblemente subyacentes a los efectos antitumorales de los medios acondicionados derivados de células madre probados por los inventores según lo informado anteriormente podría ser la inhibición de la vía de señalización de Wnt/β-catenina.

EJEMPLO COMPARATIVO

Materiales y métodos

Se cultivó HepG2 en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina a 100 µg/ml y estreptomycin a 100 µg/ml, y se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % a 37 °C.

- 40 Se cultivaron HLSC en α-MEM/EBM (3:1), complementado con suero bovino fetal al 10 %. El día antes de la recogida del MA de HLSC, se incubaron las HLSC solo con α-MEM complementado con suero bovino fetal al 10 % para eliminar los factores de crecimiento contenidos en el medio EBM. Este cambio del medio se realizó antes de cada uno de los experimentos que se realizaron.

Ensayo de apoptosis

- 45 Se sembraron HepG2 a 8.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en DMEM bajo en glucosa (Sigma) con FCS al 10 % y en presencia del 16 % de MA concentrado 25 veces obtenido de HLSC o MSC, o en presencia de 3 ng/ml de TGF-β. La apoptosis se evaluó con el ensayo TUNEL tras 24 horas.

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA con la prueba de comparación múltiple de Newmann-Keuls.

Resultados

5 La incubación de HepG2 con MA de HLSC durante 24 horas, potenció significativamente la apoptosis en comparación con el control incubado solo con vehículo. El MA de MSC también potenció la apoptosis de HepG2, así como de TGF- β , pero significativamente menos en comparación con el MA de HLSC.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10.

10 La Figura 10 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de apoptosis *in vitro* llevado a cabo incubando HepG2 con MA de HLSC concentrado 25 veces (16 %) o con MA de MSC (16 %), o con TGF- β (3 ng/ml) tras 24 horas. La apoptosis de HepG2 se evaluó como el porcentaje de células apoptóticas. Los resultados se expresan como la media $\pm$ DT de un experimento realizado por duplicado. *HepG2 tratado con MA de HLSC (16 %) o MA de MSC (16 %), o con TGF- β (3 ng/ml) frente a HepG2 sin tratar, $p < 0,05$; § HepG2 tratado con MA de HLSC (16 %) frente a HepG2 tratado con MA de MSC (16 %) o con TGF- β (3 ng/ml), $p < 0,005$.

REIVINDICACIONES

1. Un medio acondicionado que comprende una pluralidad de proteínas secretadas por células y que se puede obtener cultivando, en un medio líquido de cultivo celular, una célula madre adulta capaz de diferenciarse en una pluralidad de tipos de células diferenciadas, para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad tumoral, **caracterizado por que** la célula madre adulta capaz de diferenciarse en una pluralidad de tipos de células diferenciadas es una célula madre hepática no ovalada.
2. El medio acondicionado para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, que está libre de células.
3. El medio acondicionado para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, que se puede obtener mediante un método que comprende las etapas de:
 - (i) cultivar la célula madre adulta capaz de diferenciarse en una pluralidad de tipos de células diferenciadas en un medio líquido de cultivo celular durante un período de tiempo predeterminado; y
 - (ii) retirar la fracción celular del medio líquido de cultivo celular, Obteniéndose así un medio acondicionado libre de células que comprende una pluralidad de proteínas secretadas por células.
4. El medio acondicionado para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la fracción celular se retira del medio líquido de cultivo celular mediante centrifugación o filtración.
5. El medio acondicionado para el uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde el método comprende además la etapa de:
 - (iii) retirar del medio acondicionado libre de células la fracción de materia que tiene un peso molecular nominal inferior a 3 kDa.
6. El medio acondicionado para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la fracción de materia que tiene un peso molecular nominal inferior a 3 kDa se retira del medio acondicionado libre de células mediante ultrafiltración.
7. El medio acondicionado para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula madre hepática no ovalada es capaz de diferenciarse en una célula hepática madura, una célula productora de insulina, una célula osteogénica y una célula epitelial.
8. Una célula madre adulta capaz de diferenciarse en una pluralidad de tipos de células diferenciadas, para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad tumoral, en donde se inhibe el crecimiento y la proliferación tumoral, **caracterizado por que** la célula madre adulta capaz de diferenciarse en una pluralidad de tipos de células diferenciadas es una célula madre hepática no ovalada.
9. El medio acondicionado para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la célula madre adulta para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad tumoral es un tumor sólido.
10. El medio acondicionado para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la célula madre adulta para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el medio acondicionado o la célula madre adulta es para la administración por inyección.

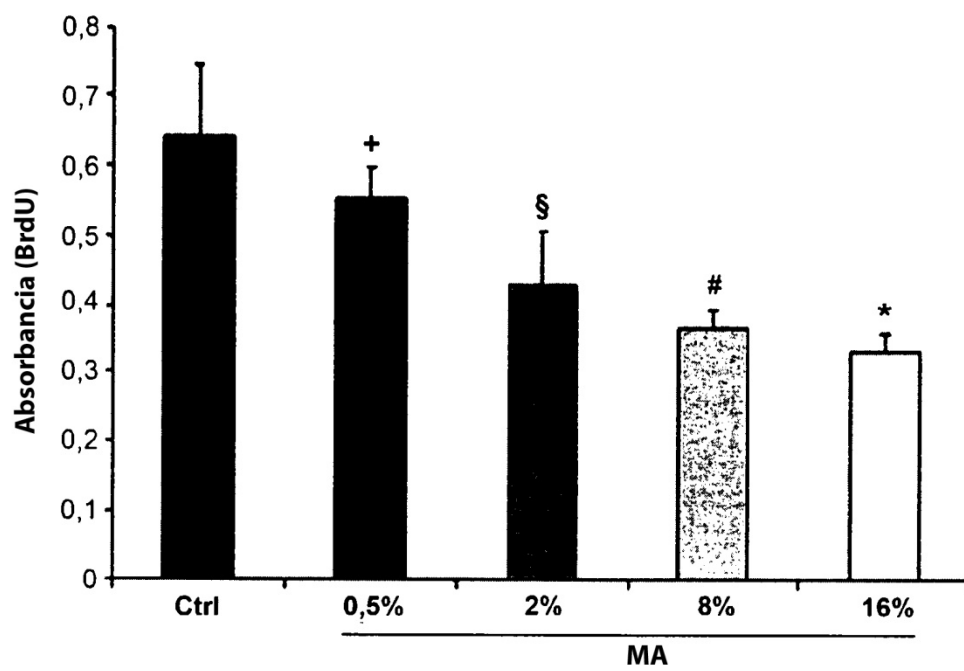


Figura 1

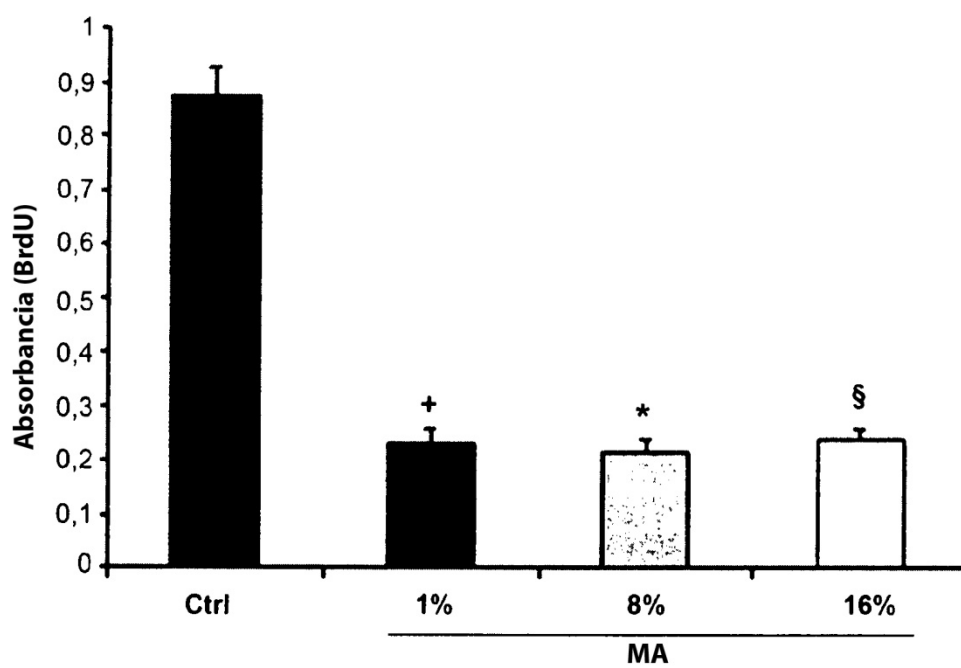


Figura 2

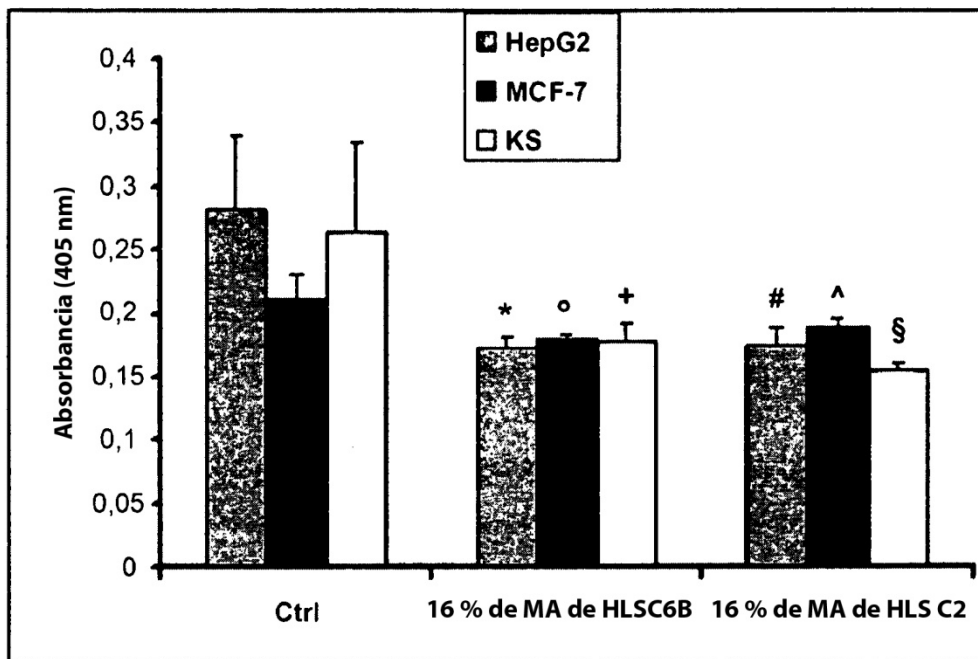


Figura 3

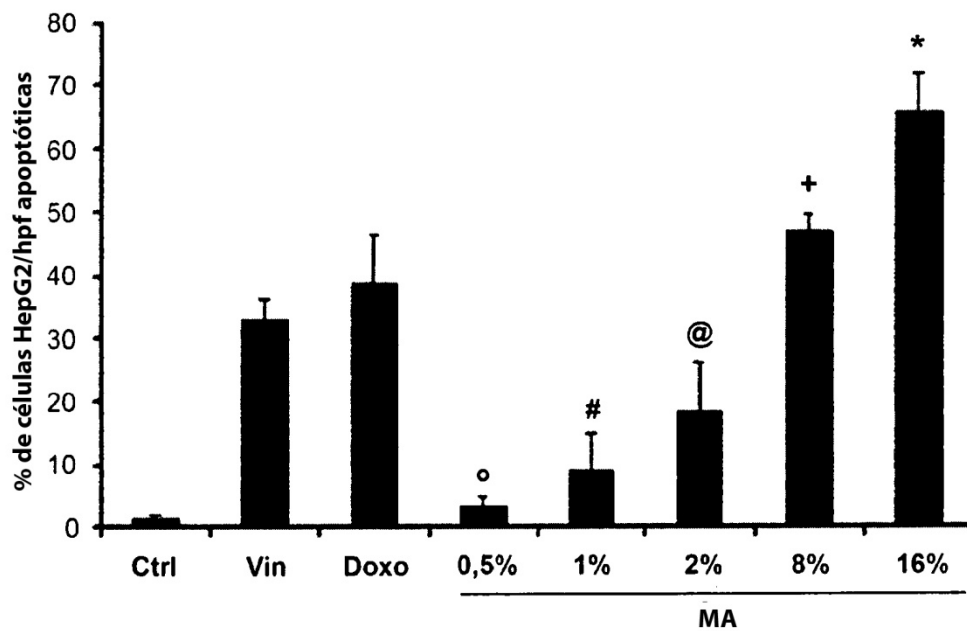


Figura 4

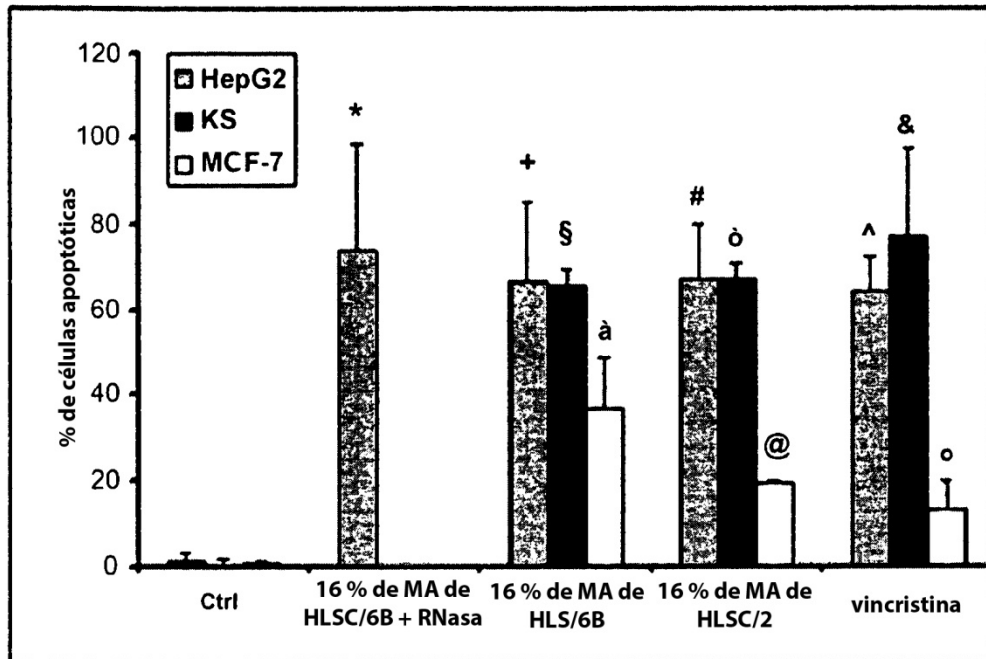


figura 5

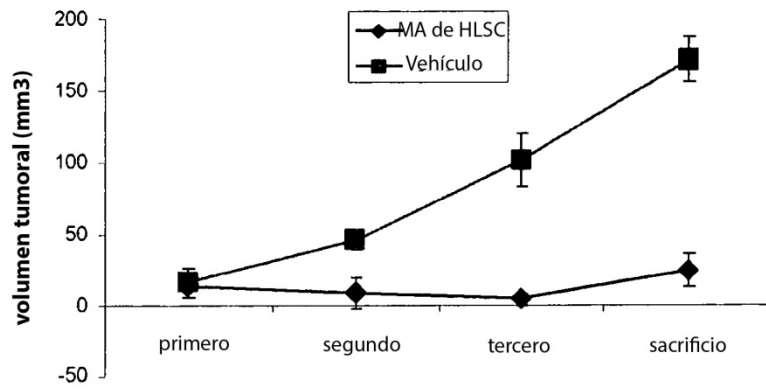


figura 6

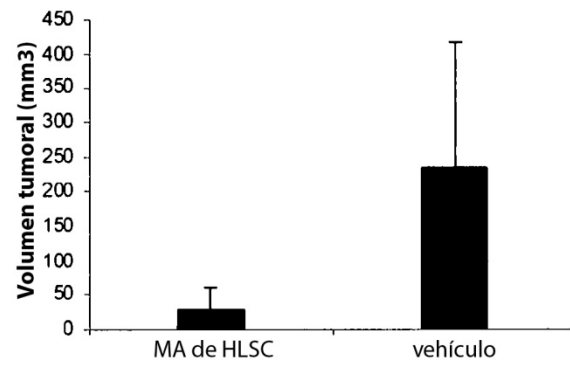


Figura 7

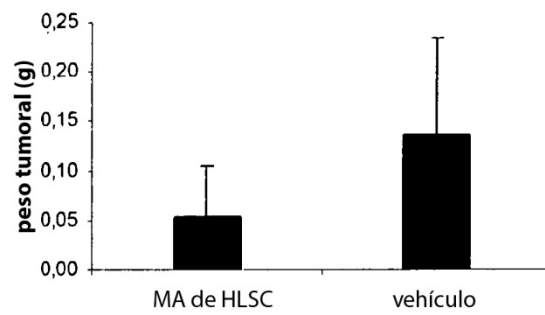


Figura 8

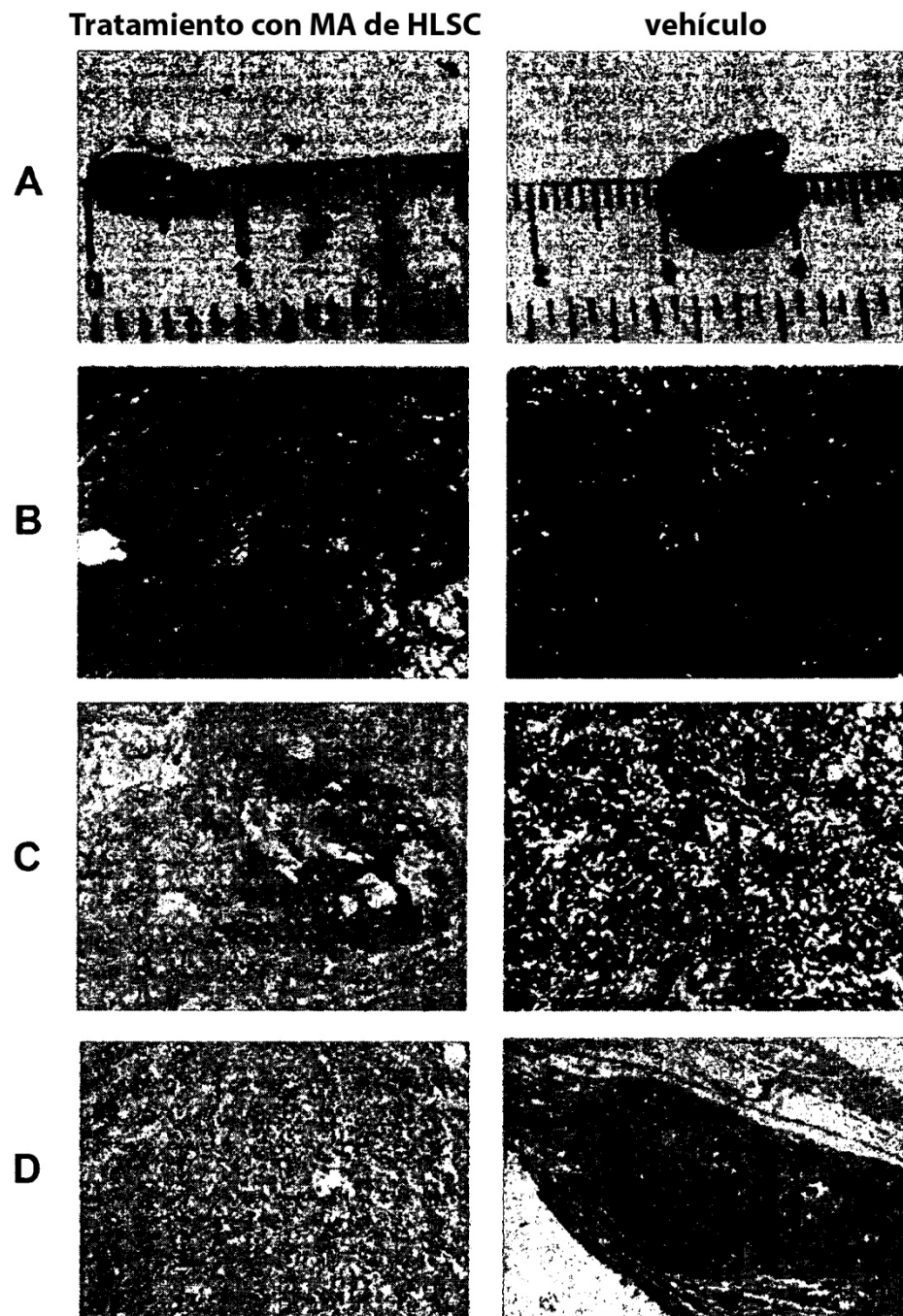


Figura 9

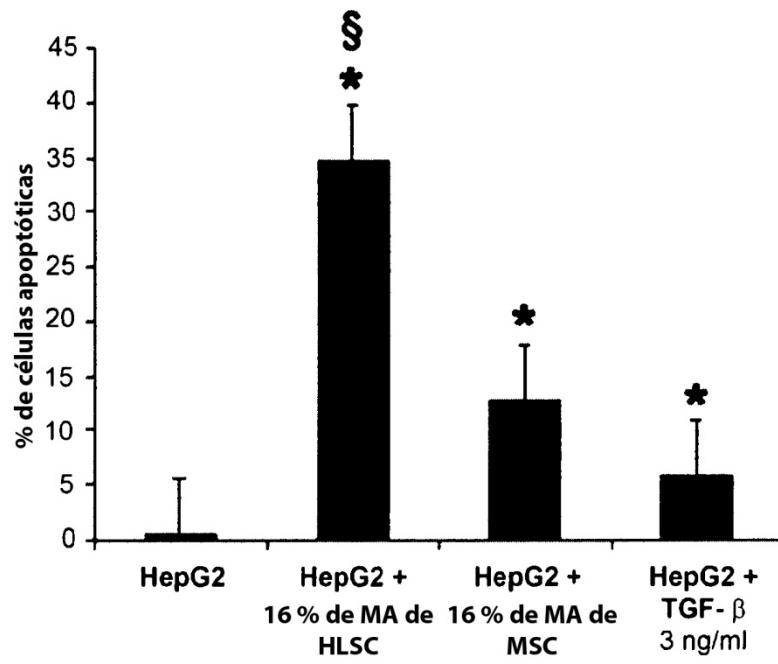


Figura 10