

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 678**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2006.01)
A61K 35/50 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)
A61K 9/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2008 E 08854636 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2247285**

54 Título: **Agente terapéutico celular para la incontinencia urinaria que comprende células madre originadas a partir de decidua**

30 Prioridad:

30.11.2007 KR 20070124010

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

22.07.2014

73 Titular/es:

**RNL BIO CO., LTD. (100.0%)
1596-7 Bongcheon-dong, Gwanak-gu
Seoul 151-050, KR**

72 Inventor/es:

**RA, JEONG CHAN;
LEE, HANG YOUNG;
JO, JUNG YOUN y
KIM, YUN JUNG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 478 678 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

Agente terapéutico celular para la incontinencia urinaria que comprende células madre originadas a partir de decidua

5 **CAMPO TÉCNICO**

La presente invención se refiere a un agente terapéutico celular para el tratamiento de la incontinencia urinaria, y más particularmente a un agente terapéutico celular para el tratamiento de la incontinencia urinaria, que contiene células madre derivadas de la decidua de la placenta o el fluido menstrual.

10

TÉCNICA DE ANTECEDENTES

Células madre se refieren a células que tienen no sólo capacidad de autorreplicación, sino también la capacidad de diferenciarse en al menos dos células, y pueden dividirse en células madre totipotentes, células madre pluripotentes y células madre multipotentes.

15

Células madre totipotentes son células con propiedades totipotentes, capaces de desarrollarse para formar un individuo perfecto, y estas propiedades son poseídas por las células hasta el estadio de 8 células tras la fertilización de un oocito y un espermatozoide. Cuando estas células se aíslan y trasplantan en el útero, pueden desarrollarse para formar un individuo perfecto. Células madre pluripotentes, que son células capaces de desarrollarse para formar diversas células y tejidos derivados de las capas ectodérmica, mesodérmica y endodérmica, se derivan de una masa celular interna situada dentro de blastocistos generados 4-5 días después de la fertilización. Estas células se denominan "células madre embrionarias", y pueden diferenciarse en otras diversas células del tejido, pero no forman nuevos organismos vivos. Células madre multipotentes son células madre capaces de diferenciarse en sólo células específicas para los tejidos y órganos que contienen estas células.

20

25

Las células madre multipotentes fueron aisladas por primera vez de médula ósea de adultos (Y. Jiang *et al.*, *Nature*, 418:41, 2002), y luego también se encontraron en otros diversos tejidos adultos (C.M. Verfaillie, *Trends Cell Biol.*, 12:502, 2002). En otras palabras, a pesar de que la médula ósea es la fuente de células madre más ampliamente conocida, las células madre multipotentes también se encontraron en la piel, vasos sanguíneos, músculos y cerebros (J.G. Tomas *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 3:778, 2001; M. Sampaolesi *et al.*, *Science*, 301:487, 2003; Y. Jiang *et al.*, *Exp. Hematol.*, 30:896, 2002). Sin embargo, las células madre están muy rara vez presentes en los tejidos adultos tal como la médula ósea, y este tipo de células son difíciles de cultivar sin inducir una diferenciación y, por lo tanto, son difíciles de cultivar en ausencia de medios rastreados específicamente. Es decir, es muy difícil mantener las células madre aisladas *in vitro*.

30

35

Recientemente, se encontró que el tejido adiposo era una nueva fuente de células madre multipotentes (B. Cousin *et al.*, *BBRC*, 301:1016, 2003; A. Miranville *et al.*, *Circulation*, 110:349, 2004; S. Gronthos *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 189:54, 2001; M.J. Seo *et al.*, *BBRC*, 328:258, 2005). A saber, se informó que un grupo de células no diferenciadas están incluidas en tejido adiposo humano obtenida mediante liposucción y tiene la capacidad de diferenciarse en células grasas, células osteogénicas, mioblastos y condroblastos (P.A. Zuk *et al.*, *Tissue Eng.*, 7:211, 2001; A.M. Rodríguez *et al.*, *BBRC*, 315:255, 2004). Este tejido adiposo tiene la ventaja de que se puede extraer en grandes cantidades y, por lo tanto, recibe atención como una nueva fuente de células madre, que pueden superar las deficiencias existentes. También, estudios recientes utilizando experimentos de modelo con animales describen que células derivadas de tejido adiposo tienen las capacidades de regenerar músculos y estimular la diferenciación de los vasos sanguíneos neurales. Por lo tanto, estas células derivadas de tejido adiposo están siendo la atención como una nueva fuente de células madre.

40

45

Los autores de la presente invención han cultivado previamente tejido de placenta finamente cortado en un medio que contiene colagenasa y bFGF, células de placenta aisladas del caldo de cultivo, y después se dejó que las células madre aisladas se diferenciaron en miocitos, células osteogénicas, neurocitos, adipocitos, condrocitos y células beta pancreáticas (Publicación de Patente Coreana N°. 2007-0101756 A).

50

Mientras tanto, la incontinencia urinaria en mujeres es causada por la flacidez de la uretra y la vejiga, lo cual resulta en un debilitamiento de los músculos del suelo pélvico que surgen de la lesión del nervio pudiendo debido a partos frecuentes y al envejecimiento. En la actualidad, el número de pacientes de incontinencia urinaria femenina en Corea se estima en aproximadamente 4.000.000-5.000.000 y está aumentando cada año debido a un rápido aumento en el número de mujeres de edad. Por lo tanto, la incontinencia urinaria femenina se está convirtiendo en un problema social grave en todo el mundo. Para tratar a los pacientes de incontinencia urinaria, se utilizan la terapia de inyección o terapia quirúrgica para el apoyo a la uretra y la vejiga. Actualmente, la terapia quirúrgica, que es un método invasivo, tiene un problema debido a que pueden aparecer complicaciones, y la terapia de inyección tiene problemas debido a que

60

emplea sustancias caras y, por lo tanto, no se puede aplicar fácilmente a todos los pacientes y debido a que tiene una tasa de éxito de sólo 50-60%, de manera que se requieren de nuevo la inyección y la cirugía.

La terapia de inyección de células madre no necesita anestesia y permite una fácil inyección de células madre en el esfínter uretral. Por lo tanto, si la terapia de inyección de células madre puede mejorar la contractilidad del esfínter uretral y aumentar la presión del punto de fuga, la terapia de células madre se puede utilizar ventajosamente para tratar la incontinencia urinaria. Sin embargo, no existe ningún estudio sobre el uso de células madre para tratar la incontinencia urinaria, excepto la descripción del documento US 2005/0025755, en donde se utilizan células regenerativas derivadas de tejido adiposo.

Por consiguiente, los autores de la presente invención han hecho muchos esfuerzos para desarrollar un agente para tratar la incontinencia urinaria que contiene células madre y, como resultado, encontraron que células madre derivadas de la decidua placentaria son eficaces para el tratamiento de la incontinencia urinaria, completando con ello la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

Por lo tanto, es un objeto principal de la presente invención proporcionar un agente terapéutico celular para el tratamiento de la incontinencia urinaria, que contenga, como ingrediente activo, células madre derivadas de la decidua de la placenta o el fluido menstrual.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para la preparación de un agente terapéutico celular para el tratamiento de la incontinencia urinaria, que contiene, como ingrediente activo, células madre derivadas de la decidua de la placenta o el fluido menstrual.

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de células madre derivadas de la decidua de la placenta o el fluido menstrual para la prevención o el tratamiento de la incontinencia urinaria.

Otras características y formas de realización de la presente invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es una fotografía microscópica que muestra la morfología de las células madre mesenquimales (MSCs – siglas en inglés) derivadas de la decidua de la placenta.

La FIG. 2 es un diagrama gráfico que muestra el nivel de duplicación de la población acumulada (CPDL– siglas en inglés) como una función del número de pases de las células madre derivadas de la decidua.

La FIG. 3 es una fotografía que muestra que las células deciduales de primer paso cultivadas en medio SFM formaban esferas.

La FIG. 4 es una fotografía que muestra los resultados obtenidos mediante el análisis de los antígenos de superficie de MSCs derivadas de la decidua, utilizando un citómetro de flujo (FACS).

La FIG. 5 es una fotografía que muestra los resultados del análisis inmunocitoquímico realizado utilizando los anticuerpos indicados [A: OCT4; B: SSEA4; y C: CD44, CD54 y control].

La FIG. 6 muestra los resultados de la RT-PCR para OCT4 [pista 1: marcador; pista 2: control de reacción RT; pista 3: células madre amnióticas; pista 4: células madre derivadas de la decidua; y pista 5: control de la reacción PCR].

La FIG. 7 es una fotografía microscópica que muestra los resultados de análisis inmunocitoquímico (α Miosina-FITC) para células madre derivadas de la decidua inducidas durante 10 días en medio MM-3160 (medio SKBM para la diferenciación miogénica) en la miogénesis.

La FIG. 8 es una fotografía que muestra que el nervio pudendo de un ratón inmunológicamente deficiente está cortado transversalmente.

La FIG. 9 es una fotografía que muestra un proceso de medir la presión del punto de fuga utilizando una mesa inclinada (A y B).

La FIG. 10 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la presión del punto de fuga se medido de acuerdo con los resultados obtenidos en el Ejemplo 6 (A: presión del punto de fuga a las 4 semanas, B: presión del punto de fuga a las 8 semanas, N: grupo normal, D: grupo control, P1: grupo experimental 1, y P2: grupo experimental 2).

5 La FIG. 11 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la presión del punto de fuga medida de acuerdo con los resultados obtenidos en el Ejemplo 7 (A: presión del punto de fuga a las 4 semanas, B: presión del punto de fuga a las 8 semanas, N: grupo normal, D: grupo control, A1: grupo experimental 1, y A2: grupo experimental 2).

10 La FIG. 12 es una fotografía que muestra un proceso de medir la contractilidad del esfínter uretral utilizando un baño de órganos (A y B).

15 La FIG. 13 es un diagrama gráfico que muestra la contractilidad del esfínter uretral medida por la estimulación de campo eléctrico, de acuerdo con los resultados obtenidos en el Ejemplo 8 (A: contractilidad del esfínter uretral a las 4 semanas; B: contractilidad del esfínter uretral a las 8 semanas, N: grupo normal; D: grupo control; P1: grupo experimental 1 y P2: grupo experimental 2).

20 La FIG. 14 es un diagrama gráfico que muestra la contractilidad del esfínter uretral mediante la administración medida de acetilcolina, de acuerdo con los resultados obtenidos en el Ejemplo 8 (A: contractilidad del esfínter uretral a las 4 semanas; B: contractilidad del esfínter uretral a las 8 semanas, N: grupo normal; D: grupo control; P1: grupo experimental 1, y P2: grupo experimental 2).

25 La FIG. 15 es un diagrama gráfico que muestra la contractilidad del esfínter uretral medida por la estimulación de campo eléctrico, de acuerdo con los resultados obtenidos en el Ejemplo 9 (A: contractilidad del esfínter uretral a las 4 semanas; B: contractilidad del esfínter uretral a las 8 semanas, N: grupo normal; D: grupo control; A1: grupo experimental 1, y A2: grupo experimental 2).

30 La FIG. 16 es un diagrama gráfico que muestra la contractilidad del esfínter uretral medida por la administración de acetilcolina, de acuerdo con los resultados obtenidos en el Ejemplo 9 (A: contractilidad del esfínter uretral a las 4 semanas; B: contractilidad del esfínter uretral a las 8 semanas, N: grupo normal; D: grupo control; A1: grupo experimental 1, y A2: grupo experimental 2).

La FIG. 17 muestra los resultados de la tinción con H/E, la inmunotinción con SMA y la inmunotinción con MyHC del tejido uretral de ratones hembras inmunológicamente deficientes, llevadas a cabo en el Ejemplo 10.

35 La FIG. 18 muestra los resultados de la inmunotinción con H/E del tejido uretral de ratones machos, de acuerdo con los resultados obtenidos en el Ejemplo 10.

40 La FIG. 19 muestra los resultados de la tinción con H/E, la inmunotinción con SMA y la inmunotinción con MyHC del tejido uretral de ratones hembras inmunológicamente deficientes, de acuerdo con los resultados obtenidos en el Ejemplo 11.

La FIG. 20 muestra los resultados de la inmunotinción con H/E del tejido uretral de ratones machos, de acuerdo con los resultados obtenidos en el Ejemplo 11.

45 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION, Y REALIZACIONES PREFERIDAS**

En un aspecto, la presente invención se refiere a un agente terapéutico celular para el tratamiento de la incontinencia urinaria, que contiene células madre derivadas de la decidua de la placenta o el fluido menstrual, en calidad de un ingrediente activo.

50 En la presente invención, las células madre derivadas de la decidua de la placenta tienen las siguientes características: (a) muestran inmunofenotipos positivos para CD29 y CD90, pero negativos para CD31 y CD45; (b) muestran inmunofenotipos positivos para Oct4, SSEA-4 y Cripto-1; (c) se desarrollan fijadas a plástico, mostrando características morfológicas de forma redonda o de husillo, y formando esferas en medio SFM de manera que sean capaces de ser mantenidas en un estado no diferenciado durante un largo periodo de tiempo; y (d) tienen la capacidad de diferenciarse en miocitos.

1. Definición de términos y expresiones

60 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "célula madre" se refiere a una célula maestra que se puede reproducir indefinidamente para formar las células especializadas de tejidos y órganos, e incluye células madre

pluripotentes y multipotentes en desarrollo. Una célula madre puede dividirse para producir dos células madre hijas, o una célula madre hija y una célula progenitora ("tránsito"), que luego prolifera para dar células maduras de los tejidos, totalmente formadas.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "diferenciación" se refiere a un fenómeno en el que está especializada la estructura o función de las células durante la división, la proliferación y el crecimiento de las mismas, es decir, la característica o función de la célula o tejido de un organismo cambia con el fin de realizar un trabajo dado a la célula o el tejido. En general, se refiere a un fenómeno en el que un sistema relativamente simple se divide en dos o más sistemas parciales, cualitativamente diferentes. Por ejemplo, esto significa que se produce una diferencia cualitativa
10 entre las partes de cualquier sistema biológico, que han sido idénticas entre sí al principio, por ejemplo se produce una distinción tal como una cabeza o un cuerpo, entre las partes del huevo, que han sido cualitativamente idénticas una con otra al principio en el desarrollo ontogénico, o se produce una distinción tal como una célula muscular o una célula nerviosa entre las células, o el sistema biológico se divide en partes cualitativamente distinguibles o sistemas parciales como resultado de la misma.

15 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "agente terapéutico celular" se refiere a un fármaco utilizado con el propósito de tratamiento, diagnóstico y prevención, que contiene una célula o tejido preparado a través del aislamiento a partir de seres humanos, el cultivo y la operación específica (tal como se proporciona por la FDA de EE.UU.). Específicamente, se refiere a un fármaco utilizado con el propósito de tratamiento, diagnóstico y prevención a través de una serie de comportamientos de multiplicación *in vitro* y de clasificación de células vivas autólogas, alogénicas y xenogénicas o de cambio de las características biológicas de células por otros medios con el fin de recuperar las funciones de las células y tejidos. Agentes terapéuticos celulares se dividen en términos generales, de acuerdo con el nivel de diferenciación de las células, en agentes terapéuticos de células somáticas y agentes terapéuticos de células madres. La presente invención se refiere particularmente a un agente terapéutico celular que contiene células madre derivadas de decidua
20
25

2. Aislamiento y purificación de células madre derivadas de decidua

30 La placenta se forma para un embrión durante el embarazo y generalmente tiene la forma de un disco que tiene un peso de aproximadamente 500 g, un diámetro de aproximadamente 15-20 cm y un espesor de 2-3 cm. Una cara de la placenta está en contacto con el cuerpo de la madre, y la otra cara está en contacto con un embrión. El espacio en la placenta contiene la sangre de la madre para el suministro de nutrientes al embrión. La placenta se compone de tres capas: amnios, corion y decidua. El amnios es una membrana delgada y transparente que rodea al embrión y contiene líquido amniótico, y las células madre de un embrión están presentes en el amnios. La decidua es una membrana
35 formada como resultado de un proceso en el que se modifican las células epiteliales del útero de manera que un huevo fertilizado se implanta en la pared uterina. La decidua contiene las células madre de la madre. En la presente invención, las células madre se aislaron de la decidua.

40 Células madre derivadas de la decidua, aisladas de la expresión placenta humana de acuerdo con la presente invención se clasifican como células madre adultas autólogas, que no causan problemas éticos, ya que se derivan de tejido de la placenta.

45 Las células madre se aíslan y purifican generalmente de la decidua de la placenta a través del siguiente método. Después de la expulsión de la placenta de mamíferos (preferiblemente la placenta humana) desde el útero, la decidua se aísla de la placenta, se trata y se cultiva para producir células madre multipotentes, células madre derivadas de la decidua de la placenta y otros biomateriales. Células madre derivadas de la decidua de la placenta se obtienen de la placenta expulsada del útero. En una realización preferida, la placenta se cultiva en presencia de factores de crecimiento, por ejemplo bFGF (siglas inglesas de Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico).

50 En la presente invención, células madre se aislaron y purificaron a partir de la decidua placentaria humana a través del siguiente método. Tejidos de la decidua fueron aislados de muestras de tejido de placenta humana y se lavaron con PBS, y luego los tejidos de la decidua se cortan finamente. Los tejidos de la decidua finamente cortados se transfirieron a una placa de 100 mm, y luego se degradaron químicamente en-DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco, Gibco) con contenido en colagenasa a 37°C durante 1 hora.

55 Los tejidos descompuestos químicamente se filtraron a través de una malla de 100 µm para separar los tejidos no descompuestos, y después se centrifugaron a 1200 rpm durante 1-10 minutos. El sobrenadante se filtró con succión, y los gránulos remanentes en el fondo se lavaron con PBS, y después se centrifugaron a 1200 rpm durante 1-10 minutos. Los gránulos remanentes en el fondo fueron bien suspendidos como células individuales, y después se cultivaron en un medio DMEM con contenido en bFGF. En este momento, las células madre mesenquimales se fijaron al fondo, y las otras células se suspendieron.
60

Células madre de este tipo, derivadas de la decidua placentaria, crecieron fijadas al plástico y mostraron características morfológicas de forma redonda y husillo. Después de dos días, las células no fijadas al fondo del plato se lavaron con PBS y se cultivaron reemplazando el medio en un intervalo de 2-3 días, obteniendo de este modo una disolución de células madre derivadas de la decidua, aisladas de la placenta humana.

Se examinó la tasa de proliferación de las células madre derivadas de la decidua y, como resultado, se pudo observar que estas células mostraban un aumento gradual en CPDL hasta el paso número 12, lo que sugiere que estas células tenían una alta tasa de proliferación (FIG. 2)

Las células madre obtenidas, derivadas de la decidua de la placenta forman esferas en medio SFM y, por lo tanto, se pueden mantener en un estado no diferenciado durante un largo período de tiempo (FIG 3). Un ejemplo de medio SFM utilizable en la presente invención puede ser MEBM (siglas inglesas de medio basal epitelial mamario) que contiene B27 al 2%, 2-mercaptoetanol 500 mM, 1 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 20 ng/ml de EGF y 20 ng/ml de bFGF. El número y tipo de células proliferadas pueden ser fácilmente controlados midiendo los cambios en la morfología y marcadores de la superficie celular usando técnicas estándares de detección de células tales como citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (p. ej., tinción con anticuerpos específicos para el tejido o específicos para marcadores de células), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS – siglas en inglés), clasificación de células activadas por magnetismo (MACS– siglas en inglés), o mediante el examen de la morfología de las células utilizando un microscopio óptico o microscopio confocal, o midiendo los cambios en la expresión de genes utilizando técnicas bien conocidas en la técnica tales como la PCR y el perfilado de la expresión génica. En una realización preferida, las células madre derivadas de la decidua de la placenta o el fluido menstrual madre se clasifican utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo centrifugación en gradiente de densidad, separación de células por magnetismo, citometría de flujo y otros métodos de separación de células. Métodos de obtener células madre multipotentes que expresan los antígenos de superficie deseados a partir del caldo de células madre derivadas de la decidua de la placenta o el fluido menstrual obtenido anteriormente incluyen un método FACS utilizando un citómetro de flujo con función de clasificación (*Int. Immunol.*, 10(3):275, 1998), un método que utiliza perlas magnéticas y un método de selección utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente células madre multipotentes (*J. Immunol.*, 141(8): 2797, 1998). También, los métodos para la obtención de células madre multipotentes a partir de una gran cantidad de caldo de cultivo incluyen un método en el que se utilizan anticuerpos que reconocen específicamente moléculas expresadas en la superficie de células (a los que se alude en lo que sigue en esta memoria como "antígenos de superficie"), solos o en combinación como columnas.

Métodos de clasificación de citometría de flujo pueden incluir un método de carga de la gota de agua y un método de captura de células. En una realización, anticuerpos o ligandos específicos para marcadores de la superficie celular se marcan con marcadores fluorescentes distintos. Las células se procesan a través de un clasificador de células, permitiendo la separación de las células en base a su capacidad para unirse a los anticuerpos utilizados. Partículas clasificadas según FACS se pueden depositar directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o 384 pocillos para facilitar la separación y clonación.

En cualquiera de estos métodos, un anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno en la superficie celular está marcado con fluorescencia, la intensidad de fluorescencia emitida por un anticuerpo unido con la molécula expresada en la superficie de la célula se convierte en una señal eléctrica mediante la cual se puede cuantificar la cantidad expresada del antígeno. También es posible separar las células que expresan una pluralidad de antígenos de superficie por combinación de tipos de fluorescencia utilizados para ello. Ejemplos de fluorescencias que pueden utilizarse en este caso incluyen FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (alo-ficocianina), TR (rojo texas), Cy 3, citocromo, rojo 613, rojo 670, TRI-color, rojo quantum, etc.

Métodos de FACS utilizando un citómetro de flujo incluyen: un método en el que se recoge el caldo de células madre anterior, del que se aíslan células, por ejemplo mediante centrifugación, y se tiñen directamente con anticuerpos; y un método en el que se cultivan las células y se hacen crecer en un medio adecuado y luego se tiñen con anticuerpos. La tinción de las células se realiza mezclando un anticuerpo primario que reconoce un antígeno de superficie con una muestra de célula diana e incubando la mezcla a 4°C durante 30 minutos a 1 hora. Cuando el anticuerpo primario está marcado fluorescentemente, las células se aíslan con un citómetro de flujo después del lavado. Cuando el anticuerpo primario no está marcado fluorescentemente, las células reaccionaron con el anticuerpo primario y un anticuerpo secundario marcado fluorescente que tiene actividad de unión al anticuerpo primario se mezclan después del lavado y se incuban a 4 °C durante 30 minutos a 1 hora. Después del lavado, las células teñidas con los anticuerpos primario y secundario se aíslan con un citómetro de flujo.

3. Características de las células madre derivadas de la decidua placentaria

Las células madre aisladas de la decidua placentaria son homogéneas y estériles. Además, las células madre se obtienen fácilmente en una forma adecuada para la administración a seres humanos, es decir, son de calidad farmacéutica.

5 Después del cultivo a largo plazo, las células se pueden caracterizar con series CD de marcadores de antígenos de superficie, por ejemplo CD29 (marcador de células mononucleares), CD31 (marcador de células endoteliales y células madre), CD45 (marcador de células hematopoyéticas) y CD90 (marcador de células madre mononucleares), y pueden ser sometidas a un análisis FACS.

10 Células madre derivadas de la placenta de la decidua, preferidas, obtenidas por el método de la presente invención pueden ser identificadas por la presencia de marcadores de la superficie celular que tienen las siguientes características: muestran inmunofenotipos positivos para CD29 y CD90, pero negativos para CD31 y CD45. Marcadores de la superficie celular de este tipo se determinan de forma rutinaria de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, p. ej. por citometría de flujo, seguido de lavado y tinción con un anticuerpo anti-marcador de la superficie celular.

15 También, las células madre derivadas de la decidua de la placenta de acuerdo con la presente invención se pueden identificar usando marcadores Oct4, SSEA4 y Cripto-1 que pueden ser considerados como un marcador no diferenciado para las células madre (FIGS. 4, 5 y 6). Oct4 es bien conocido como un marcador no diferenciado para células madre, y es general para ensayar la capacidad de expresión de Oct4 con el fin de identificar las células madre en un estado no diferenciado tal como se describe en la solicitud de patente coreana N° 10-2004-0105716, titulada "Anticuerpo monoclonal específico para las células madre embrionarias humanas", la solicitud de patente coreana N° 10-2004-0096780, titulada "ARN de doble cadena para la inhibición de la expresión del gen Oct4 que mantiene el estado no diferenciado de las células madre embrionarias de mamífero", la solicitud de patente coreana N° 10-2006-0092128, titulada "Células madre multipotentes humanas derivadas de la sangre del cordón umbilical que tienen una mayor capacidad de proliferar debido a la estructura a base de osteoblastos y método de preparación de las mismas", y similares. También, es bien sabido que SSEA4 (antígeno embrionario 4 específico de fase) y Cripto-1 están presentes en la superficie de las células madre embrionarias humanas.

30 La expresión de Oct4 se confirma utilizando RT-PCR (siglas inglesas de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) junto con FACS. El método de la RT-PCR es una técnica conocida en la técnica. La RT-PCR es una técnica que comprende sintetizar ADNc correspondiente utilizando ARN de una región específica como un molde y llevar a cabo la amplificación por PCR utilizando el ADNc, y consiste en las etapas de (1) preparar ADNc a partir de ARN utilizando la transcriptasa inversa, y (2) amplificar una región específica utilizando el ADNc, y la etapa (2) es la misma que un método de amplificar una región del gen específico a partir de ADN genómico. Este método se puede realizar de una manera sencilla en comparación con el análisis de ARN que ha sido posible a través de métodos tales como la hibridación por transferencia Northern, y permite determinar la secuencia de bases de un gen. Por lo tanto, este método es enormemente útil, principalmente en el estudio de la secuencia de bases y el nivel de transcripción de ARNm.

40 Las células madre derivadas de la decidua de la placenta de la presente invención son positivas para la expresión de Oct4, SSEA4 y Cripto-1 (FIGS.4, 5 y 6).

4. Diferenciación de células madre derivadas de la decidua de la placenta

45 Las células madre derivadas de la decidua de la placenta, obtenidas de acuerdo con el método de la invención, pueden ser inducidas a diferenciarse a lo largo de linajes celulares específicos, incluyendo la diferenciación en miocitos. En una realización específica, las células madre derivadas de la decidua de la placenta, obtenidas de acuerdo con el método de la invención, son inducidas a diferenciarse para su uso en el trasplante y protocolos *ex vivo* de tratamiento. En una realización específica, las células madre derivadas de la decidua de la placenta, obtenidas de acuerdo con el método de la invención, son inducidas a diferenciarse en un tipo de célula particular y están diseñadas genéticamente para proporcionar un producto génico terapéutico.

55 La diferenciación de las células madre derivadas de la decidua de la placenta en miocitos particulares se puede medir de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica, y las células madre derivadas de la decidua de la placenta pueden ser inducidas a diferenciarse en miocitos tratando previamente las células madre de la decidua de la placenta con azacitidina durante un día y luego cultivando las células tratadas previamente en medio SKBM (Cambrex, Co).

60 La determinación de que las células madre se han diferenciado en miocitos se puede lograr por métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., midiendo los cambios en la morfología y marcadores de la superficie celular (p. ej., tñiendo células con anticuerpos específicos para el tejido o específicos para el marcador de la célula) utilizando técnicas

tales como citometría de flujo o inmunocitoquímica, o examinando la morfología de las células utilizando un microscopio óptico o microscopio confocal, o midiendo cambios en la expresión de genes utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como la PCR y perfilado de expresión génica.

5 5. Uso de células madre derivadas de deciduas de la placenta y células diferenciadas a partir de ellas

Las células madre derivadas de la decidua de la placenta de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para una amplia diversidad de protocolos terapéuticos en los que se ve aumentado, reparado o reemplazado el tejido u órgano del cuerpo, por el injerto, el trasplante o la infusión de una población de células deseada, tal como una célula madre derivada de la decidua de la placenta o una población de células madre derivada de la decidua de la placenta. Las células madre derivadas de la decidua de la placenta de la presente invención se pueden utilizar para reemplazar o aumentar tejidos existentes, para hacer crecer tejidos nuevos o alterados, o para unir los tejidos con los tejidos o estructuras biológicas.

En una forma de realización preferida de la presente invención, las células madre derivadas de la decidua de la placenta se pueden utilizar en trasplantes autólogos y alogénicos, incluyendo trasplantes hematopoyéticos HLA-coincidentes y HLA-discordantes.

Las células madre derivadas de la decidua de la placenta de la presente invención se pueden utilizar en lugar de clases específicas de células progenitoras (p. ej., condrocitos, células madre, células hematopoyéticas, células del parénquima pancreático, neuroblastos, células progenitoras de la musculatura, etc.) en protocolos terapéuticos o de investigación en los que típicamente se utilizan células progenitoras.

Además, las células madre derivadas de la decidua de la placenta de la presente invención se pueden formular como preparaciones inyectables (p. ej., documento WO 96/39101 incorporado en esta memoria como referencia en su totalidad). En una realización alternativa, las células y los tejidos de la presente invención se pueden formular utilizando hidrogeles polimerizables o reticulantes tal como se describe en los documentos US 5.709.854, 5.516.532 y 5.654.381, cada uno de los cuales se incorpora en esta memoria como referencia en su totalidad.

6. Desarrollo de agente para el tratamiento de la incontinencia urinaria que contiene células madre derivadas de la decidua placentaria

El agente terapéutico celular de la invención para el tratamiento de la incontinencia urinaria que contiene células madre derivadas de la decidua de la placenta se basa en el principio en el que las células madre derivadas de la decidua de la placenta aumentan la presión del punto de fuga, lo que indica una mejora en la función de esfínter uretral interno, y un aumento de la contractilidad del esfínter uretral, lo que indica una mejora en la función del esfínter uretral externo.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "presión del punto de fuga" se refiere a que la presión intravesical en el momento de la fuga de orina o la presión del punto de fuga de Valsalva, y la disminución de la presión del punto de fuga es una de las principales causas de la incontinencia urinaria.

En la presente invención, con el fin de medir el efecto de las células madre derivadas de la decidua de la placenta en el tratamiento de la incontinencia urinaria, particularmente en la presión del punto de fuga, ratones hembra inmunológicamente deficientes fueron divididos en un grupo normal, un grupo control y grupos experimentales. Después se aumentó la presión intravesical en cada uno del grupo normal, el grupo control (en el que se cortó el nervio pudendo) y los grupos experimentales (en los que se cortó el nervio pudendo y luego se inyectaron las células madre derivadas de la decidua de la placenta o las células madre derivadas de tejido adiposo), y se midió la presión del punto de fuga en cada uno de los grupos. Como resultado, se confirmó que las células madre derivadas de la decidua de la placenta de acuerdo con la presente invención aumentan la presión del punto de fuga y, por lo tanto, se pueden utilizar como un agente para tratar la incontinencia urinaria.

Las funciones de los músculos del esfínter uretral para regular la micción debido a la contractilidad de los mismos, y el debilitamiento del músculo del esfínter uretral es también una causa principal de la incontinencia urinaria.

En la presente invención, con el fin de medir el efecto de las células madre derivadas de la decidua de la placenta en el tratamiento de la incontinencia urinaria, en particular sobre la contractilidad del esfínter uretral, ratones machos se dividieron en un grupo normal, un grupo control y grupos experimentales. Después, al segmento de tejido uretral de cada uno de los grupos se le aplicó una estimulación de campo eléctrico o un fármaco de acetilcolina, y se midió la contractilidad del esfínter uretral en cada uno de los grupos. Como resultado, se confirmó que las células madre derivadas de la decidua de la placenta de acuerdo con la presente invención aumentaron la contractilidad del esfínter

uretral y, por lo tanto, se pueden utilizar como un agente terapéutico celular para el tratamiento de la incontinencia urinaria.

7. Agente terapéutico celular para el tratamiento de la incontinencia urinaria que contiene células madre derivadas de la decidua placentaria o células madre derivadas de la decidua de fluido menstrual

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "decidua placentaria" se refiere a una membrana formada como resultado de un proceso en el que se modifican las células epiteliales del útero de manera que un huevo fertilizado se implanta en la pared uterina.

Tal como se utiliza en esta memoria, el fluido menstrual contiene moco cervical, descarga vaginal, células uterinas, células epiteliales del útero y vasos sanguíneos capilares, y se compone principalmente de proteínas que forman células y similares. En esta memoria, a las células epiteliales del útero, desprendidas del útero y contenidas en el fluido menstrual, se las alude como "la decidua de fluido menstrual".

Tal como se describió anteriormente, la decidua placentaria y la decidua de fluido menstrual se componen principalmente de células epiteliales uterinas. En los Ejemplos de la presente invención, sólo se demostró específicamente el efecto terapéutico incontinencia urinaria de las células madre derivadas de la decidua placentaria, pero se puede inferir fácilmente que las células madre derivadas de la decidua de fluido menstrual también tienen el efecto de tratar la incontinencia urinaria. Por lo tanto, resultará obvio para una persona experta en la técnica que la presente invención hace que sea posible realizar no sólo un agente terapéutico celular para el tratamiento de la incontinencia urinaria que contiene células madre derivadas de la decidua placentaria, sino también un agente terapéutico celular para el tratamiento de la incontinencia urinaria que contiene células madre derivadas de la decidua de fluido menstrual.

Ejemplos

En lo que sigue se describirá con mayor detalle la presente invención con referencia a ejemplos. Ha de entenderse, sin embargo, que estos ejemplos son para fines ilustrativos solamente y no deben interpretarse que limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo de células madre de acuerdo con la presente invención

Aislamiento y cultivo de células madre derivadas de la decidua placentaria

La decidua fue aislada de la placenta de la siguiente manera, de acuerdo con el método descrito en la publicación de patente coreana N° 10-2007-0101756A, presentada a nombre de la solicitante. Específicamente, las placentas se recogieron de partos normales y partos prematuros en el Hospital Guro, Centro Médico de la Universidad de Corea, de acuerdo con las Directrices de la Junta de Revisión Institucional del Centro Médico de la Universidad de Corea y se utilizaron para fines de investigación. Los tejidos de la placenta fueron transferidos al laboratorio en un estado en el que estaban contenidos en solución salina fisiológica que contenía un antibiótico. Los tejidos de la placenta transferidos al laboratorio se lavaron con PBS para separar las células de la sangre y diversos otros tejidos, o los tejidos se trataron con tampón de hemolisis para separar células de la sangre, o cada uno de los tejidos de amnios, corion, decidua y lecho placentario que constituyen la placenta fueron cuidadosamente aislados utilizando fórceps.

Cada uno de los tejidos aislados de la decidua se colocó en una placa de 100 mm y se cortó finamente con una tijera esterilizada a un tamaño de 1-2 mm. Después, el tejido cortado se dispuso en un medio con contenido en colagenasa y se incubó en una incubadora a 37°C durante 1-4 horas, después de lo cual los tejidos tratados con colagenasa se filtraron a través de una malla 100 tela metálica. Las células, así aisladas, se dispusieron en un matraz de 75 y se cultivaron en un medio DMEM que contiene bFGF a 37°C en una condición de 5% de CO₂ (FIG. 1).

Ejemplo 2: Examen de la tasa de proliferación de células madre derivadas de la decidua placentaria

Se examinó la tasa de proliferación de las células madre obtenidas de acuerdo con el método de proliferación de las células madre multipotentes humanas derivadas del tejido de la decidua placentaria, descrito anteriormente. Células madre derivadas de la decidua placentaria, que resultan de las muestras de tejido de la decidua placentaria de diferentes individuos humanos se obtuvieron a través del método de aislamiento descrito en el Ejemplo 1, y luego se sembraron en un matraz de 75 a una densidad de 2x10⁵ células.

CPDL es un índice indicativo de la tasa de proliferación de células y se expresa como la siguiente ecuación:

$$CPDL = \ln(N_f/N_i)/\ln 2$$

en donde Ni: el número inicial de células sembradas; y Nf: el número final de células.

El CPDL de las células madre derivadas de decidua se observó de acuerdo con el número de pasos y, como resultado, las células mostraron un valor de CPDL de aproximadamente 30 en el paso 12. Este valor de CPDL era similar al de las células madre derivadas de tejido adiposo humano (Lin *et al.*, *stem cells and development*, 14:92, 2005; Zuk *et al.*, *Tissue eng.*, 7:211, 2001). Estos resultados sugieren que las células madre derivadas de la decidua placentaria de acuerdo con la presente invención tienen una muy alta tasa de proliferación (FIG. 2).

Ejemplo 3: Características inmunológicas de células madre multipotentes derivadas de la decidua placentaria

Las células madre multipotentes derivadas de la decidua placentaria, obtenidas en el Ejemplo 1, se lavaron con PBS y se trataron con tripsina. Después, las células se recogieron y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Después se desechó el sobrenadante, las células se suspendieron en PBS y se dispensaron en cada uno de los pocillos a una densidad celular de 1×10^5 células. Un anticuerpo (anticuerpo monoclonal anti-humano de ratón conjugado con R-ficoeritrina) se dispuso en cada uno de los pocillos, y las células se incubaron a 4°C durante 40 minutos. Después de la incubación, el caldo celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Después de haber retirado el sobrenadante, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Entonces, después de haber separado el sobrenadante, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Después haber retirado el sobrenadante, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% y se analizaron utilizando un citómetro de flujo. Como resultado del análisis, las características inmunológicas de las células madre derivadas de la decidua placentaria de acuerdo con la presente invención, como se puede ver en la Tabla 1, las células mostraron inmunofenotipos positivos para CD29, CD90, Oct-4, SSEA-4 y Cripto -1, pero negativos para CD31 y CD45 (FIG. 4).

Tabla 1: Análisis del antígeno de superficie (análisis FACS) de células madre derivadas de la decidua placentaria

Antígeno	MSCs de decidua
CD29	+
CD31	-
CD45	-
CD90	+
Oct-4	+
SSEA-4	+
Cripto-1	+

Ejemplo 4: Análisis de Oct4 y SSEA-4 expresión de células madre multipotentes derivadas de la placenta decidua

Las células madre derivadas de la decidua placentaria, obtenidas en el Ejemplo 1, se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con PBS que contiene paraformaldehído al 4% durante 30 minutos. Después de lavar tres veces con PBS, las células se permeabilizaron con PBS que contiene Triton-X100 al 0,1% durante 10 minutos. Después de lavar tres veces con PBS, las células se trataron con tampón de bloqueo (suero de cabra al 5%) y se incubaron a 4°C durante una hora, y después se dejó que reaccionaran durante una noche con un tampón de bloqueo que contiene el anticuerpo primario. Después de lavar tres veces con PBS, se dejó que las células reaccionaran con un anticuerpo secundario en una habitación oscura durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBS, se montaron las células. Como resultado tal como se muestra en la FIG. 5, las células madre multipotentes de acuerdo con la presente invención fueron positivas para Oct4 y SSEA-4 que son marcadores para células madre embrionarias humanas.

También se analizó la expresión de Oct4 utilizando RT-PCR. La reacción de RT se realizó durante 50 minutos a 37°C y durante 10 minutos a 70°C, y la reacción de PCR se realizó durante 5 minutos a 95°C, y 40 ciclos, consistiendo cada uno en 30 s a 95°C, 40 s a 58°C y 1 min a 72°C, y luego durante 10 minutos a 72°C. Como resultado tal como se muestra en la FIG. 6, se podía observar que las células madre derivadas de decidua se expresaron en 800 pb.

Ejemplo 5: Diferenciación de células madre multipotentes derivadas de la decidua placentaria en miocitos

Las células madre multipotentes derivadas de la decidua placentaria, obtenidas en el Ejemplo 1, fueron dispensadas a un matraz de 10 ng/ml revestido con fibronectina, y luego fueron tratadas previamente con 5'-azacitidina 10 µM durante 24 horas. Después del tratamiento previo, las células se cultivaron en SKBM (Cambrex, Co.) durante 10 días, seguido de inmunotinción.

Como resultado, las células madre multipotentes derivadas de tejido de la placenta de acuerdo con la presente invención fueron positivas para la miosina que es un antígeno específico para la célula del músculo. Este resultado sugiere que las células madre multipotentes humanas derivadas de tejido de la placenta según la presente invención se

diferenciaron en miocitos (FIG. 7).

Ejemplo 6: Medición de la presión del punto de fuga en ratones hembras inmunológicamente deficientes a los que se inyectaron células madre derivadas de la decidua placentaria

5 (1) Preparación del modelo experimental con animales

Con el fin de medir el efecto de las células madre derivadas de la decidua placentaria sobre la presión del punto de fuga se utilizaron 56 ratones hembras inmunológicamente deficientes. Los ratones hembras inmunológicamente deficientes se dividieron en un grupo normal (n = 14), un grupo control (n = 14; en el que se cortó el nervio pudendo), un grupo experimental 1 (n = 14; al que se inyectaron 10^5 células madre derivadas de la decidua placentaria 2 semanas después de cortar el nervio pudendo) y un grupo experimental 2 (n = 14; al que se inyectaron 10^7 células madre derivadas de la decidua placentaria 2 semanas después de cortar el nervio pudendo). Cada uno de los grupos se subdividió en un grupo de 4 semanas (n = 7) y un grupo de 8 semanas (n = 7) y se midió la presión del punto de fuga a las 4 semanas y 8 semanas.

Preparación del grupo control: 14 ratones hembras inmunológicamente deficientes fueron anestesiados con halotano, y la fosa isquiorrectal se diseccionó bilateralmente para cortar transversalmente el nervio pudendo. Después, se electrocauterizó el nervio pudendo aproximadamente 2 cm, y luego se suturó la piel.

Preparación de los grupos experimentales 1 y 2: 28 ratones hembras inmunológicamente deficientes fueron anestesiados con halotano, se abrió el abdomen mediante una incisión en la línea media baja, y luego se separaron la vejiga y la uretra (FIG. 8). Después de que apareciera una incontinencia urinaria 2 semanas después de la transección del nervio pudendo, 10^5 células madre derivadas de la decidua placentaria obtenidas en el Ejemplo 1 se inyectaron en 14 ratones mediante una jeringa Hamilton de 10 ml usando un microscopio (grupo experimental 1), y a los otros 14 ratones se inyectaron 10^7 células (grupo experimental 2).

(2) Medición de la presión del punto de fuga

30 Ratones hembras inmunológicamente deficientes fueron anestesiados con uretano (1,2 g/kg), y la médula espinal se cortó transversalmente al nivel de T9-T10. A continuación, se abrió el abdomen mediante incisión en la línea media baja para separar la vejiga, y luego se sometió a la vejiga a cistostomía suprapúbica utilizando un catéter PE-90.

35 Para la medición de la presión del punto de fuga, cada uno de los ratones hembras inmunológicamente deficientes de cada uno del grupo normal, el grupo control y los grupos experimentales se colocaron en el modelo de inclinación vertical/pinza de presión intravesical (FIG. 9). 150 ml de solución salina fisiológica se conectaron a un tubo de PE-90, y la altura de la solución salina se incrementó ligeramente cada vez para aumentar la presión intravesical de los ratones experimentales. La presión registrada al comienzo de la fuga de orina se definió como LPP (presión del punto de fuga).

40 Como se muestra en la FIG. 10, el grupo normal (N), el grupo control (D), el grupo experimental 1 (P1) y el grupo experimental 2 (P2) mostraron presiones del punto de fuga de $22,8 \pm 0,9$, $11,6 \pm 0,6$, $20,4 \pm 0,8$ y $21,5 \pm 0,9$ cm de H_2O , respectivamente, a las 4 semanas (FIG. 10A), y mostraron presiones del punto de fuga de $22,6 \pm 0,8$, $11,5 \pm 0,7$, $20,6 \pm 0,6$ y $22,5 \pm 0,8$ cm de H_2O , respectivamente, a las 8 semanas (FIG. 10B). Así, tanto a las 4 semanas como a las 8 semanas, las presiones del punto de fuga del grupo normal y de los grupos experimentales 1 y 2 fueron estadísticamente más altas que la del grupo control, y la presión del punto de fuga del grupo control era menor que la del grupo normal. Por lo tanto, en los grupos experimentales 1 y 2 a los que se administraron células madre derivadas de la decidua placentaria preparados en el Ejemplo 1, las presiones del punto de fuga se aumentaron a un nivel similar al del grupo normal, lo que sugiere que las células madre derivadas de la decidua placentaria funcionaban para aumentar la presión del punto de fuga.

50 Ejemplo 7: Medición de la presión del punto de fuga en ratones hembras inmunológicamente deficientes a los que se inyectaron células madre derivadas de tejido adiposo (ejemplo de referencia; no dentro del alcance de la presente invención)

55 (1) Preparación de modelo experimental con animales

Con el fin de medir el efecto de las células madre derivadas de tejido adiposo sobre la presión del punto de fuga se utilizaron 56 ratones hembras inmunológicamente deficientes. Los ratones hembras inmunológicamente deficientes se dividieron en un grupo normal (n = 14), un grupo control (n = 14; en el que se cortó el nervio pudendo), un grupo experimental 1 (n = 14; al que se inyectaron 10^5 células madre derivadas de tejido adiposo 2 semanas después de cortar el nervio pudendo) y un grupo experimental 2 (n = 14; al que se inyectaron 10^7 células madre derivadas de tejido

adiposo 2 semanas después de cortar el nervio pudendo). Cada uno de los grupos se subdividió en un grupo de 4 semanas ($n = 7$) y un grupo de 8 semanas ($n = 7$) y se midió la presión del punto de fuga a las 4 semanas y 8 semanas.

5 Preparación del grupo control: 14 ratones hembras inmunológicamente deficientes fueron anestesiados con halotano, y la fosa isquiorrectal se diseccionó bilateralmente para cortar transversalmente el nervio pudendo. Después, se electrocauterizó el nervio pudendo aproximadamente 2 cm, y luego se suturó la piel.

10 Preparación de los grupos experimentales 1 y 2: 28 ratones hembras inmunológicamente deficientes fueron anestesiados con halotano, se abrió el abdomen mediante una incisión en la línea media baja, y luego se separaron la vejiga y la uretra (FIG. 8). Después de que apareciera una incontinencia urinaria 2 semanas después de la transección del nervio pudendo, 10^5 células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas en el Ejemplo 1 se inyectaron en 14 ratones mediante una jeringa Hamilton de 10 ml usando un microscopio (grupo experimental 1), y a los otros 14 ratones se inyectaron 10^7 células (grupo experimental 2).

15 (2) Medición de la presión del punto de fuga

20 Ratones hembras inmunológicamente deficientes fueron anestesiados con uretano (1,2 g/kg), y la médula espinal se cortó transversalmente al nivel de T9-T10. A continuación, se abrió el abdomen mediante incisión en la línea media baja para separar la vejiga, y luego se sometió a la vejiga a cistostomía suprapúbica utilizando un catéter PE-90.

25 Para la medición de la presión del punto de fuga, cada uno de los ratones hembras inmunológicamente deficientes de cada uno del grupo normal, el grupo control y los grupos experimentales se colocaron en el modelo de inclinación vertical/pinza de presión intravesical (FIG. 9). 150 ml de solución salina fisiológica se conectaron a un tubo de PE-90, y la altura de la solución salina se incrementó ligeramente cada vez para aumentar la presión intravesical de los ratones experimentales. La presión registrada al comienzo de la fuga de orina se definió como LPP (presión del punto de fuga).

30 Como se muestra en la FIG. 11, las presiones del punto de fuga del grupo normal (N), el grupo control (D), el grupo experimental 1 (A1) y el grupo experimental 2 (A2) eran $22,8 \pm 0,9$, $11,6 \pm 0,7$, $18,7 \pm 0,9$ y $19,2 \pm 0,7$ cm de H_2O , respectivamente, a las 4 semanas ("A" de FIG. 11), y mostraron que eran $22,6 \pm 0,9$, $11,5 \pm 0,7$ y $21,5 \pm 0,8$ cm de H_2O , respectivamente, a las 8 semanas ("B" de FIG. 11). Así, se pudo confirmar que, en los grupos experimentales A1 y A2 a los que se administraron células madre derivadas de tejido adiposo de la presente invención, se incrementó la presión del punto de fuga tanto a las 4 como a las 8 semanas. También, la presión del punto de fuga del grupo A2 era mayor que la del grupo A1, pero no había diferencia estadística entre ellos (FIG. 11).

35 8. Medición de la contractilidad del esfínter uretral en ratones machos a los que se inyectaron células madre derivadas de la decidua placentaria

(1) Preparación del modelo experimental con animales

40 Con el fin de medir la influencia de las células madre derivadas de la decidua placentaria sobre la contractilidad del esfínter uretral se utilizaron 56 ratones machos. Los ratones machos se dividieron en un grupo normal ($n = 14$), un grupo control ($n = 14$; en el que se cortó transversalmente el nervio pudendo), un grupo experimental 1 ($n = 14$; al que se inyectaron 10^5 células madre derivadas de la decidua placentaria 2 semanas después de cortar el nervio pudendo) y un grupo experimental 2 ($n = 14$; al que se inyectaron 10^7 células madre derivadas de la decidua placentaria 2 semanas después de cortar el nervio pudendo). Cada uno de los grupos se subdividió en un grupo de 4 semanas ($n = 7$) y un grupo de 8 semanas ($n = 7$) y se midió la contractilidad del esfínter uretral a las 4 semanas y 8 semanas.

50 Preparación del grupo control: 14 ratones machos fueron anestesiados con halotano, y la fosa isquiorrectal se diseccionó bilateralmente para cortar transversalmente el nervio pudendo. Después, se electrocauterizó el nervio pudendo aproximadamente 2 cm, y luego se suturó la piel.

55 Preparación de los grupos experimentales 1 y 2: 28 ratones machos fueron anestesiados con halotano, se abrió la región del abdomen mediante una incisión en la línea media baja, y luego se cortaron transversalmente la vejiga y la uretra (FIG. 8). Después de que apareciera una incontinencia urinaria 2 semanas después de la transección del nervio pudendo, 10^5 células madre derivadas de la decidua placentaria obtenidas en el Ejemplo 2 se inyectaron en 14 ratones mediante una jeringa Hamilton de 10 ml utilizando un microscopio (grupo experimental 1), y a los otros 14 ratones se inyectaron 10^7 células (grupo experimental 2).

60 (2) Medición de la contractilidad del esfínter uretral

Después de obtener la uretra de cada uno de los ratones machos, la uretra fue cortada en espiral, preparando así las

secciones de tejido de la uretra (10X2 mm). En un experimento en un baño de órganos, una cámara vertical (volumen de 20 ml) fue perfundida con disolución de Tyrode tamponada con CO₂/bicarbonato, y luego las secciones de tejido uretral se fijaron en la cámara. Entonces, se examinó la contractilidad del esfínter uretral en las secciones de tejido de la uretra utilizando acetilcolina (FIG. 12).

Como resultado, como se muestra en la FIG. 13, cuando se realizó una estimulación de campo eléctrico (EFS, 60V), la cual se utiliza convencionalmente en la técnica anterior, en el experimento con ratones machos, los valores de contracción del esfínter uretral en el grupo normal (N), el grupo control (D), el grupo experimental 1 (P1) y el grupo experimental 2 (P2) eran $0,04 \pm 0,06$, $0,34 \pm 0,02$, $0,39 \pm 0,02$ y $0,45 \pm 0,05$ g/tensión, respectivamente, a las 4 semanas, y eran $0,44 \pm 0,06$, $0,35 \pm 0,02$, $0,41 \pm 0,04$ y $0,46 \pm 0,03$ g/tensión, respectivamente, a las 8 semanas. Por consiguiente, en los experimentos de estimulación del campo eléctrico, los grupos experimentales mostraron una contractilidad del esfínter uretral mayor que la del grupo control tanto a las 4 semanas como a las 8 semanas y mostraron una contractilidad del esfínter uretral similar o superior a la del grupo normal. Además, el grupo experimental 2 mostró una contractilidad del esfínter uretral mayor que la del grupo experimental 1.

Mientras tanto, tal como se muestra en la FIG. 14, cuando las muestras de ensayo se trataron con acetilcolina (Ach), los valores de contracción del esfínter uretral en el grupo normal (N), el grupo control (D), el grupo experimental 1 (P1) y el grupo experimental 2 (P2) eran $0,54 \pm 0,04$, $0,28 \pm 0,03$, $0,52 \pm 0,02$ y $0,54 \pm 0,03$ g/tensión, respectivamente, en las 4 semanas (FIG. 14A), y eran $0,56 \pm 0,03$, $0,3 \pm 0,02$, $0,56 \pm 0,04$ y $0,59 \pm 0,04$ g/tensión, respectivamente, a las 8 semanas (FIG. 14B). Por consiguiente, cuando se administró acetilcolina, la contractilidad del esfínter uretral fue mayor en todos el grupo normal y los grupos experimentales 1 y 2 que en el grupo D, y el grupo experimental 2 mostró una contractilidad del esfínter uretral más alta que la del grupo experimental 1, pero no hubo diferencia estadísticamente significativa alguna entre los mismos. En otras palabras, no se puede concluir que el grupo experimental 2 muestre una contractilidad del esfínter uretral mayor que la del grupo experimental 1.

9. Medición de la contractilidad del esfínter uretral en ratones machos a los que se inyectaron células madre derivadas de tejido adiposo (ejemplo de referencia; no dentro del alcance de la presente invención)

(1) Preparación del modelo experimental con animales

Con el fin de medir la influencia de las células madre derivadas de tejido adiposo sobre la contractilidad del esfínter uretral se utilizaron 56 ratones machos. Los ratones machos se dividieron en un grupo normal (n = 14), un grupo control (n = 14; en el que se cortó transversalmente el nervio pudendo), un grupo experimental 1 (n = 14; al que se inyectaron 10⁵ células madre derivadas de tejido adiposo 2 semanas después de cortar el nervio pudendo) y un grupo experimental 2 (n = 14; al que se inyectaron 10⁷ células madre derivadas de tejido adiposo 2 semanas después de cortar el nervio pudendo). Cada uno de los grupos se subdividió en un grupo de 4 semanas (n = 7) y un grupo de 8 semanas (n = 7) y se midió la contractilidad del esfínter uretral a las 4 semanas y 8 semanas.

Preparación del grupo control: 14 ratones machos fueron anestesiados con halotano, y la fosa isquiorrectal se diseccionó bilateralmente para cortar transversalmente el nervio pudendo. Después, se electrocauterizó el nervio pudendo aproximadamente 2 cm, y luego se suturó la piel.

Preparación de los grupos experimentales 1 y 2: 28 ratones machos fueron anestesiados con halotano, se abrió la región del abdomen mediante una incisión en la línea media baja, y luego se cortaron transversalmente la vejiga y la uretra (FIG. 8). Después de que apareciera una incontinencia urinaria 2 semanas después de la transección del nervio pudendo, 10⁵ células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas en el Ejemplo 1 se inyectaron en 14 ratones mediante una jeringa Hamilton de 10 ml utilizando un microscopio (grupo experimental 1), y a los otros 14 ratones se inyectaron 10⁷ células (grupo experimental 2).

(2) Medición de la contractilidad del esfínter uretral

Después de obtener la uretra de cada uno de los ratones machos, la uretra fue cortada en espiral, preparando así las secciones de tejido de la uretra (10X2 mm). En un experimento en un baño de órganos, una cámara vertical (volumen de 20 ml) fue perfundida con disolución de Tyrode tamponada con CO₂/bicarbonato, y luego las secciones de tejido uretral se fijaron en la cámara. Entonces, se examinó la contractilidad del esfínter uretral en las secciones de tejido de la uretra utilizando acetilcolina (FIG. 12).

Como resultado, como se muestra en la FIG. 15, cuando se realizó una estimulación de campo eléctrico (EFS, 60V), la cual se utiliza convencionalmente en la técnica anterior, en el experimento con ratones machos, los valores de contracción del esfínter uretral en el grupo normal (N), el grupo control (D), el grupo experimental 1 (A1) y el grupo experimental 2 (A2) eran $0,46 \pm 0,08$, $0,32 \pm 0,03$, $0,35 \pm 0,03$ y $0,38 \pm 0,03$ g/tensión, respectivamente, a las 4

semanas, y eran $0,44 \pm 0,06$, $0,31 \pm 0,02$, $0,39 \pm 0,02$ y $0,44 \pm 0,05$ g/tensión, respectivamente, a las 8 semanas. Por consiguiente, en los experimentos de estimulación del campo eléctrico, la contractilidad del esfínter uretral era mayor en los grupos N y A que en el grupo D tanto a las 4 semanas como a las 8 semanas y no había diferencia alguna entre el grupo A2 y el grupo A1.

Mientras tanto, tal como se muestra en la FIG. 16, cuando a las muestras de ensayo se administró acetilcolina (Ach), los valores de contracción del esfínter uretral en el grupo normal (N), el grupo control (D), el grupo experimental 1 (A1) y el grupo experimental 2 (A2) eran $0,54 \pm 0,05$, $0,29 \pm 0,04$, $0,48 \pm 0,03$ y $0,51 \pm 0,05$ g/tensión, respectivamente, a las 4 semanas (FIG. 14A), y eran $0,55 \pm 0,05$, $0,29 \pm 0,03$, $0,55 \pm 0,02$ y $0,54 \pm 0,05$ g/tensión, respectivamente, a las 8 semanas. Por consiguiente, cuando se administró acetilcolina, la contractilidad del esfínter uretral fue mayor en todos el grupo normal y los grupos experimentales 1 y 2 que en el grupo D, y el grupo experimental 2 mostró una contractilidad del esfínter uretral más alta que la del grupo experimental 1, y no había diferencia alguna entre el grupo A2 y el grupo A1.

Ejemplo 10: Inmunotinción de tejido de ratón al que se inyectaron células madre derivadas de la decidua placentaria

Después de medir la presión del punto de fuga y la contractilidad del esfínter uretral a las 4 semanas y 8 semanas de acuerdo con los Ejemplos 6 a 8 como se describe anteriormente, cada uno de los tejidos de la uretra se recogió y se congeló sin dañarlo utilizando 2-metilbutano que ya ha sido enfriado en nitrógeno líquido. Los tejidos de la uretra se enfriaron y se seccionaron, y después se sometieron a tinción H/E. También, con el fin de observar la diferenciación de las células madre en los músculos lisos y los músculos esqueléticos, los tejidos se inmunotifieron con DAPI, actina muscular (α -SMA) y la cadena pesada de la miosina (MyHC) y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 17, en los músculos del esfínter uretral normales de los ratones hembras inmunológicamente deficientes de acuerdo con el Ejemplo 6, los músculos lisos eran abundantes, y los músculos esqueléticos estaban débilmente teñidos ("A", "B" y "C" de FIG. 17). Después de la transección del nervio pudiendo, se observó la reducción de la cantidad de los músculos lisos ("D", "E" y "F" de FIG. 17). Cuando se inyectaron las células madre derivadas de la decidua placentaria, a las 4 semanas ("G", "H" e "I" de FIG. 17) y 8 semanas ("J", "K" y "L" de FIG. 17), los músculos lisos que se tiñeron de verde claro, lo que sugiere que aumentó la cantidad de los músculos lisos. También, entre los músculos lisos, se observaron células amarillas co-teñidas de rojo y verde. En la tinción de MyHC, los músculos esqueléticos fueron muy débilmente teñidos de verde, y las células inyectadas entre las células lisas mostraron un color rojo.

También, como se muestra en la FIG. 18, no se pudo observar la forma original de la uretra, porque la uretra de los ratones machos fue cortada en espiral en el Ejemplo 8 tal como se describe anteriormente; sin embargo, se observó que PKH se expresaba en el tejido después del experimento de la contractilidad del esfínter uretral ("A" y "B" de FIG. 18), lo que sugiere que las células madre derivadas de la placenta inyectadas contribuyeron a la contracción del esfínter uretral. Para referencia, PKH es una sustancia para la tinción de fluorescencia de células vivas, y en este Ejemplo, las células madre derivadas de la decidua placentaria fueron marcadas con PKH (rojo) antes de la inyección.

En conclusión, en los Ejemplos 6 a 8, en los que se construyeron modelos con animales de incontinencia urinaria de esfuerzo, de forma similar a pacientes de incontinencia urinaria, la inyección de las células madre derivadas de la decidua placentaria aumentó la presión del punto de fuga en el modelo de ratón inmunológicamente deficiente de incontinencia urinaria y aumentó la contractilidad del esfínter uretral en el modelo de ratón de incontinencia urinaria. La presión del punto de fuga no cambió en gran medida de acuerdo con el número de células madre inyectadas, pero la contractilidad del esfínter uretral aumentó a medida que aumentaba el número de células madre inyectadas. Esto sugiere que las células madre derivadas de la decidua placentaria de acuerdo con la presente invención también se pueden utilizar como excelentes agentes terapéuticos celulares en pacientes de incontinencia urinaria.

Como se mencionó anteriormente, la decidua placentaria y la decidua de fluido menstrual se componen principalmente de células epiteliales uterinas. En los Ejemplos de la presente invención, sólo se demostró específicamente el efecto terapéutico incontinencia urinaria de las células madre derivadas de la decidua placentaria, pero se puede inferir fácilmente que las células madre derivadas de la decidua de fluido menstrual también tienen el efecto de tratar la incontinencia urinaria.

Ejemplo 11: Inmunotinción de tejido de ratón al que se inyectaron células madre derivadas de tejido adiposo (ejemplo de referencia; no dentro del alcance de la presente invención)

Después de medir la presión del punto de fuga y la contractilidad del esfínter uretral a las 4 semanas y 8 semanas de acuerdo con los Ejemplos 6 a 8 como se describe anteriormente, cada uno de los tejidos de la uretra se recogió y se congeló sin dañarlo utilizando 2-metilbutano que ya ha sido enfriado en nitrógeno líquido. Los tejidos de la uretra se

enfriaron y se seccionaron, y después se sometieron a tinción H/E. También, con el fin de observar la diferenciación de las células madre en los músculos lisos y los músculos esqueléticos, los tejidos se inmunotiñeron con DAPI, actina muscular (α -SMA) y la cadena pesada de la miosina (MyHC) y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

5 Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 19, en el esfínter uretral normal de los ratones inmunológicamente deficientes preparado en el Ejemplo 7, los músculos lisos eran abundantes, y los músculos esqueléticos estaban débilmente teñidos ("A", "B" y "C" de FIG. 19). Después de la transección del nervio pudiendo, se observó la reducción de la cantidad de los músculos lisos ("D", "E" y "F" de FIG. 19). Cuando se inyectaron células madre derivadas de tejido adiposo (a las 8 semanas), los músculos lisos se tiñeron de verde, lo que sugiere que aumentó la cantidad de los
10 músculos lisos. También, entre los músculos lisos, se observaron células amarillas co-teñidas de rojo y verde. En la tinción de MyHC, los músculos esqueléticos fueron muy débilmente teñidos, y las células inyectadas entre las células lisas mostraron un color rojo.

También, como se muestra en la FIG. 20, no se pudo observar la forma original de la uretra, porque la uretra de los ratones machos fue cortada en espiral en el Ejemplo 9 tal como se describe anteriormente; sin embargo, se observó que PKH se expresaba en el tejido después del experimento de la contractilidad del esfínter uretral (8 semanas, "A" y "B" de FIG. 20), lo que sugiere que las células madre derivadas de tejido adiposo inyectadas contribuyeron a la
15 contracción del esfínter uretral. Para referencia, PKH es una sustancia para la tinción de fluorescencia de células vivas, y en este Ejemplo, las células madre derivadas de tejido adiposo fueron marcadas con PKH (rojo) antes de la inyección.

20 **APLICABILIDAD INDUSTRIAL**

Como se ha descrito anteriormente en detalle, las células madre derivadas de la decidua de la placenta o el fluido menstrual de acuerdo con la presente invención tienen una excelente capacidad de diferenciarse en miocitos y, por lo tanto, de mostrar los efectos de aumentar la presión del punto de fuga y la contractilidad del esfínter uretral. Por
25 consiguiente, las células madre son útiles como un agente para tratar la incontinencia urinaria.

A pesar de que la presente invención ha sido descrita en detalle con referencia a las características específicas, resultará evidente para los expertos en la técnica que esta descripción es sólo para una forma de realización preferida y
30 no limita el alcance de la presente invención. Así, el alcance sustancial de la presente invención quedará definido por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico celular que contiene células madre derivadas de la decidua de la placenta o fluidos menstruales, para uso en el tratamiento de la incontinencia urinaria, en donde las células madre derivadas de la decidua de la placenta tienen las siguientes características:
- 5 (a) muestran inmunofenotipos positivos para CD29 y CD90, pero negativos para CD31 y CD45;
(b) muestran inmunofenotipos positivos para Oct4, SSEA-4 y Cripto-1;
(c) se desarrollan fijadas a plástico, mostrando características morfológicas de forma redonda o de husillo, y
10 formando esferas en medio SFM de manera que sean capaces de ser mantenidas en un estado no diferenciado durante un largo periodo de tiempo; y
(d) tienen la capacidad de diferenciarse en miocitos.

FIG. 1

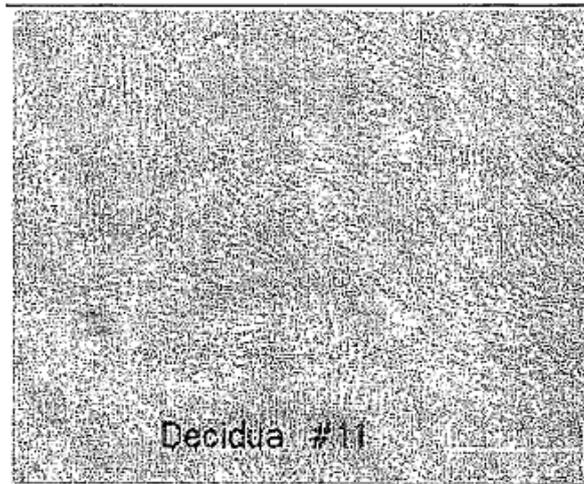


FIG. 2

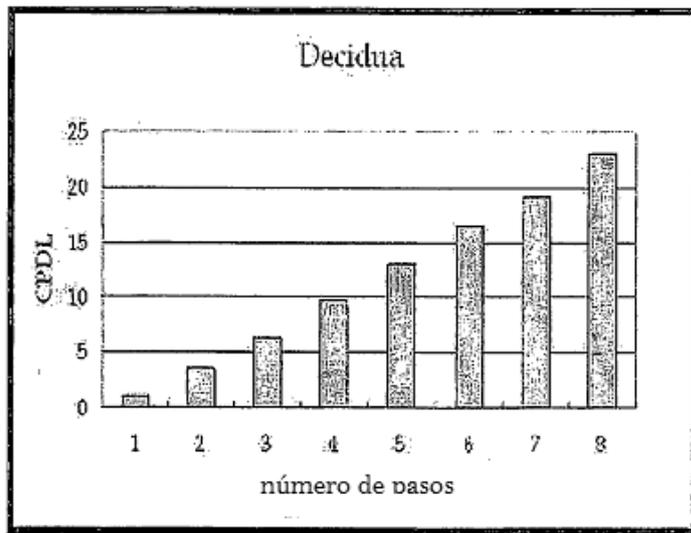


FIG. 3

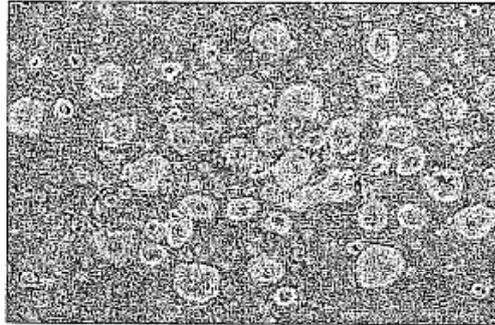


FIG. 4

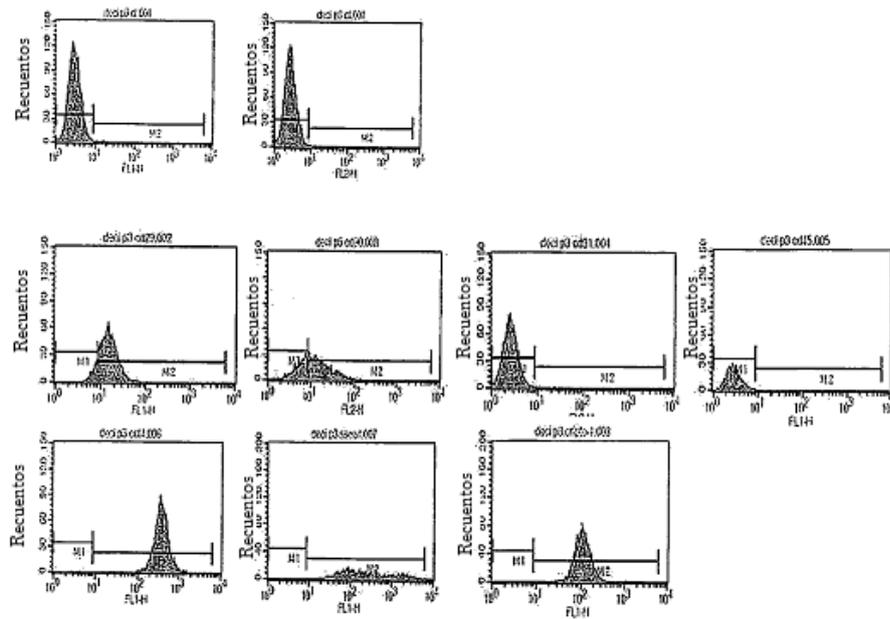


FIG. 5

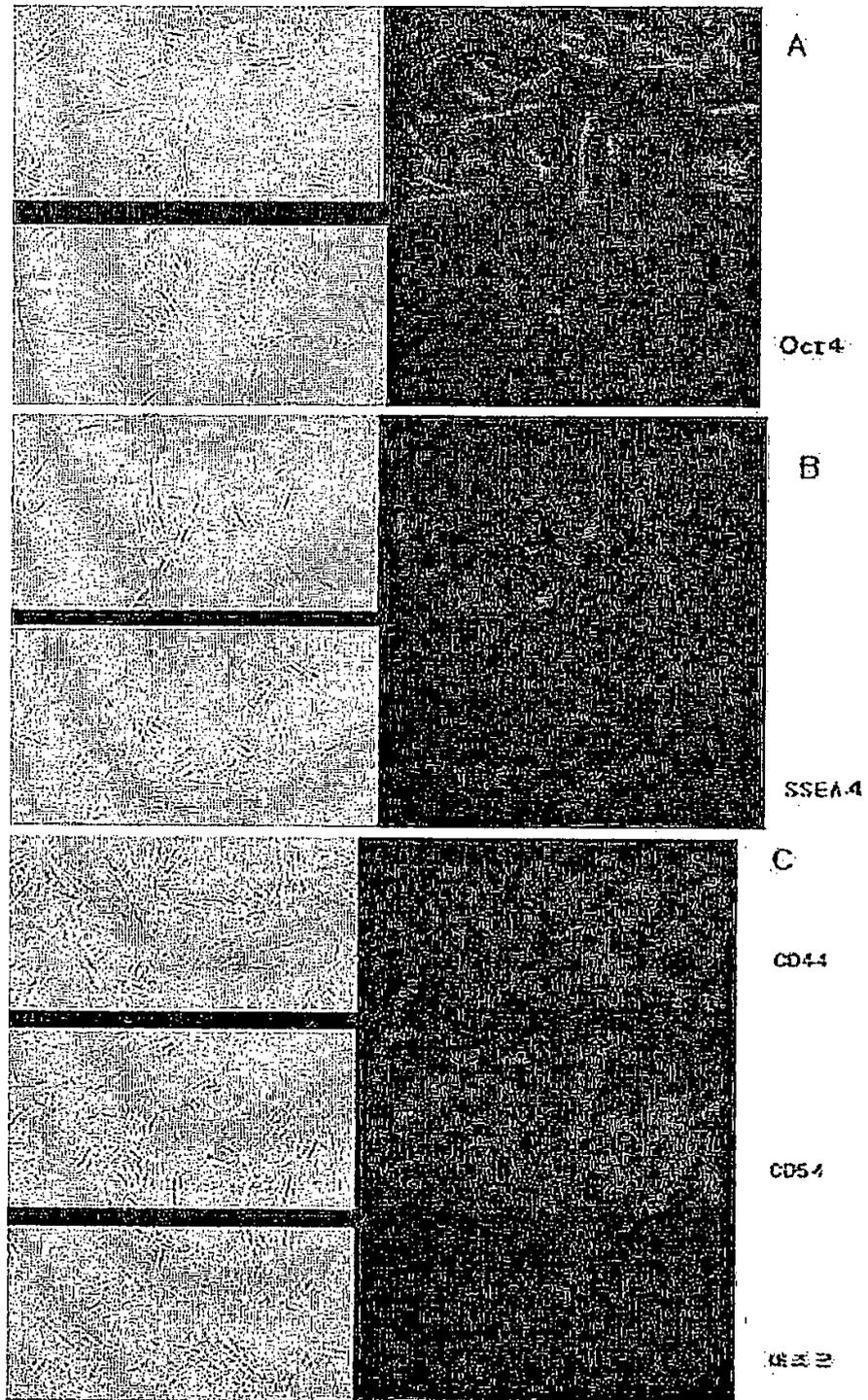


FIG. 6

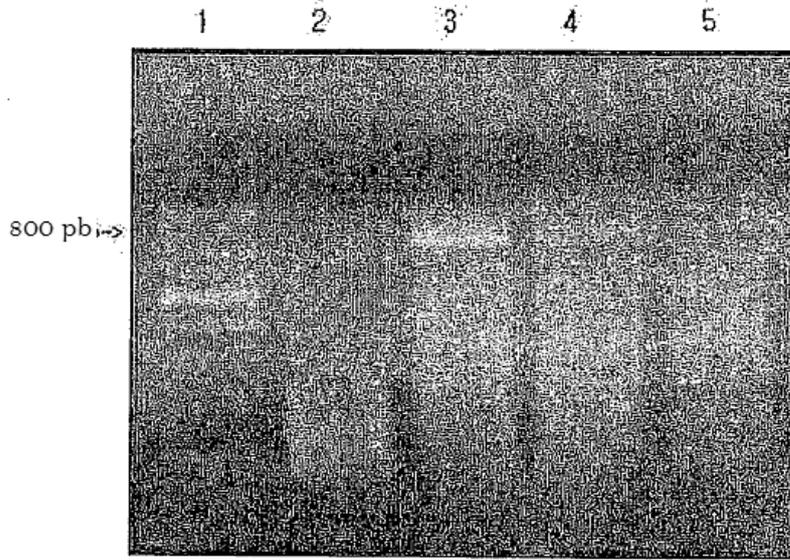
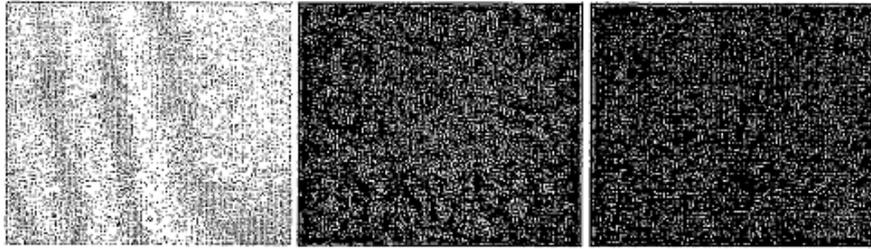


FIG. 7

Miogénesis de MSC p2 de la decidua

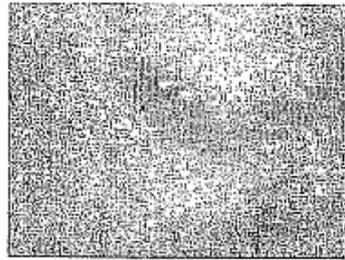
Control



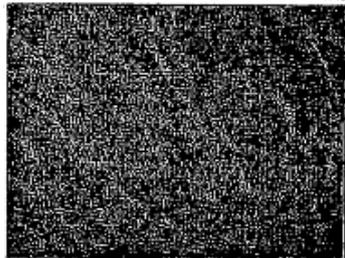
DAPI (nucleo)

FITC

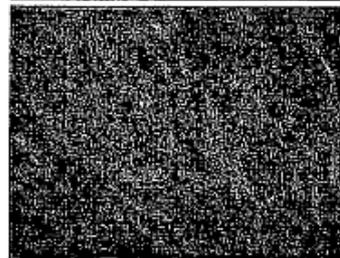
α Miosina



DAPI



FITC



merge

FIG. 8

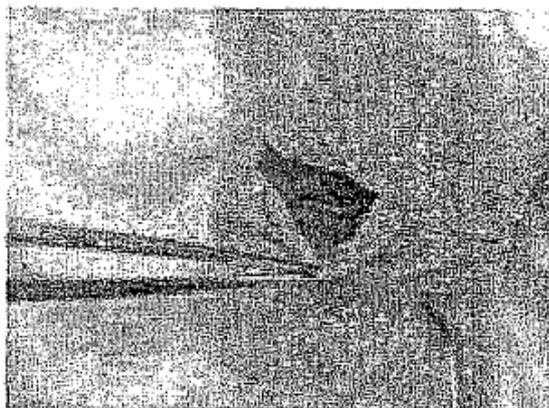


FIG. 9

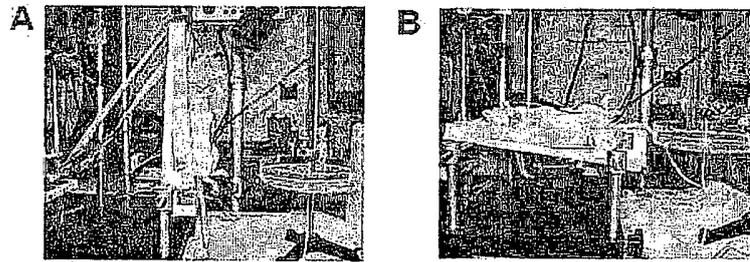


FIG. 10

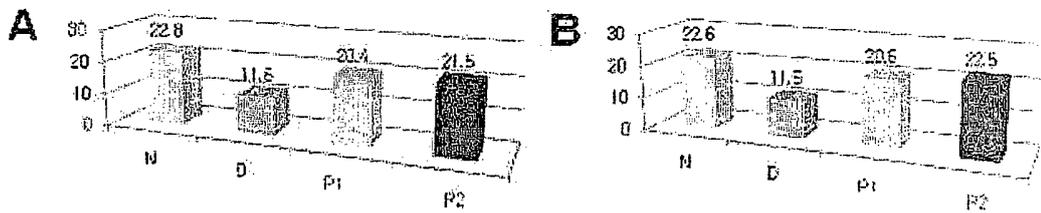


FIG. 11

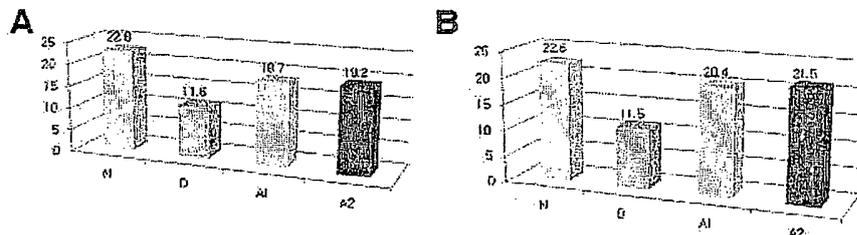


FIG. 12

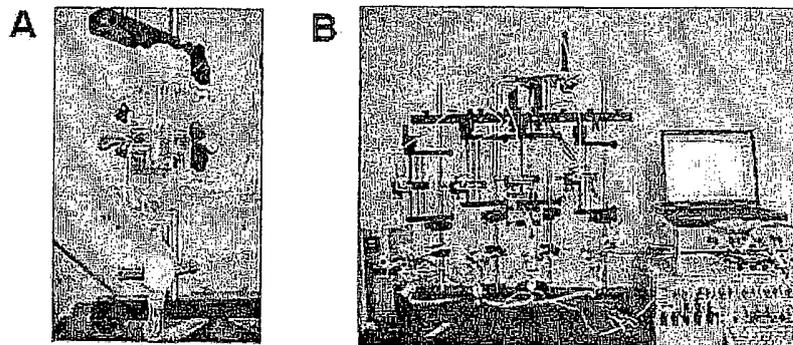


FIG. 13

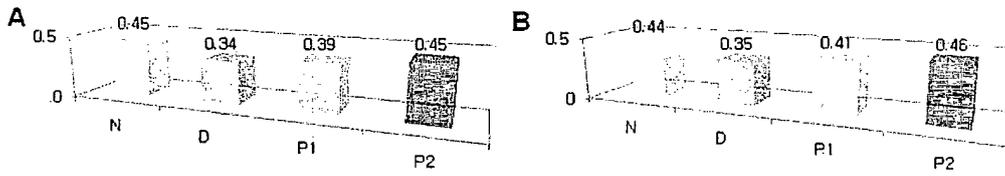


FIG. 14

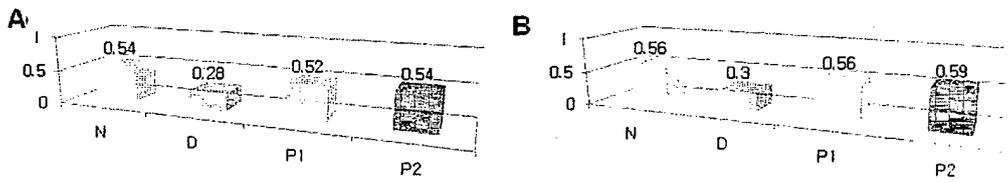


FIG. 15

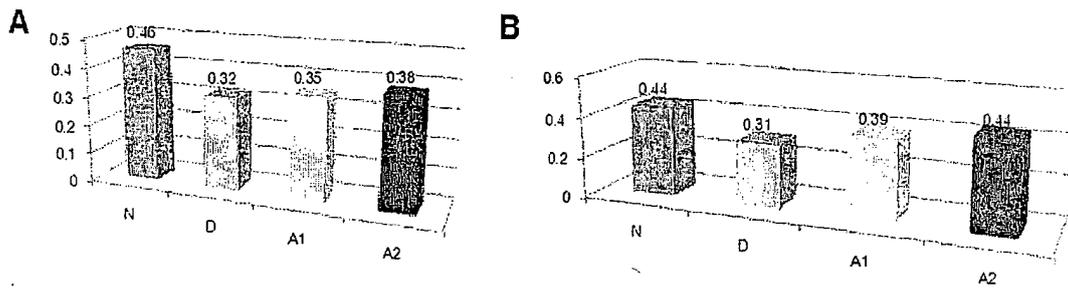


FIG. 16

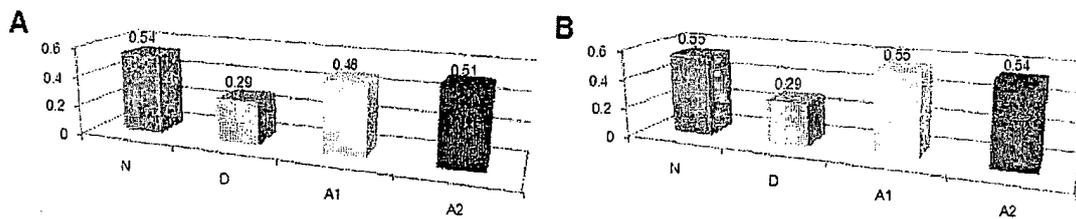


FIG. 17

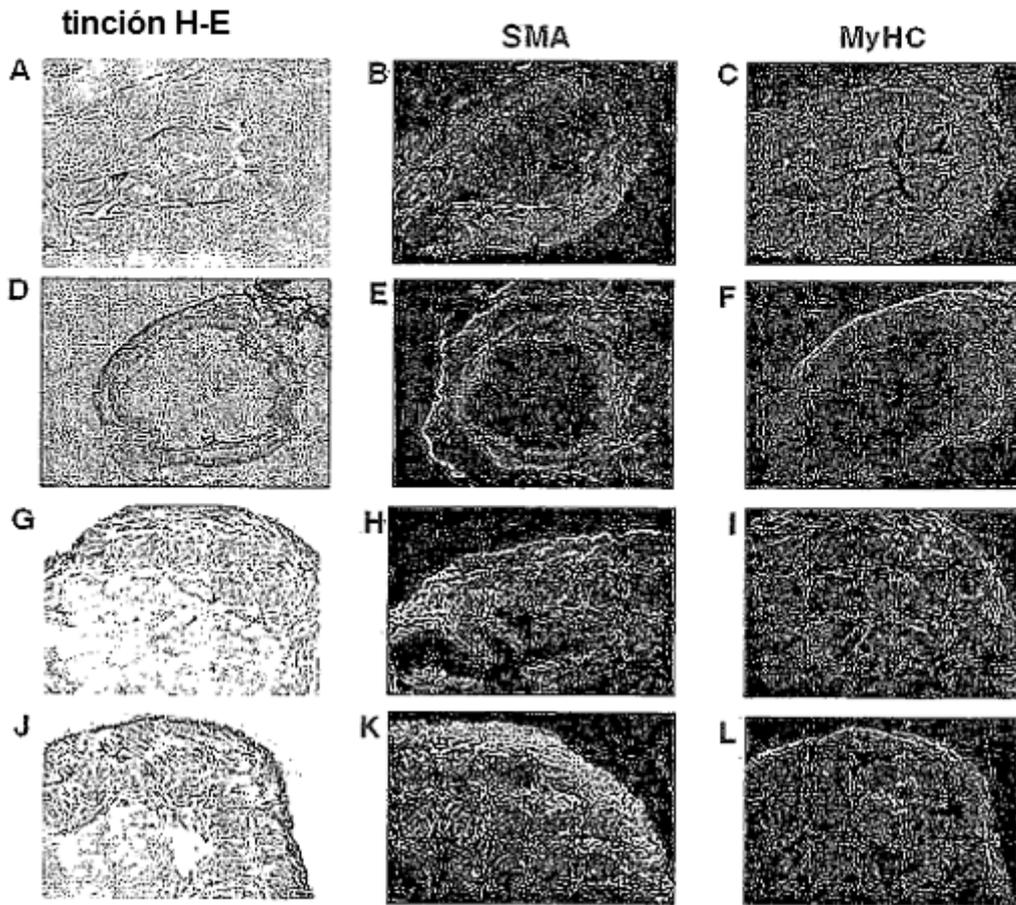


FIG. 18

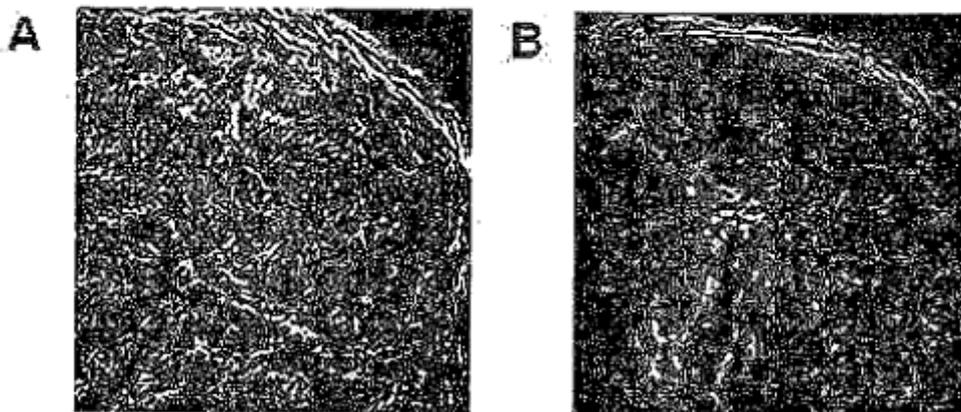


FIG. 19

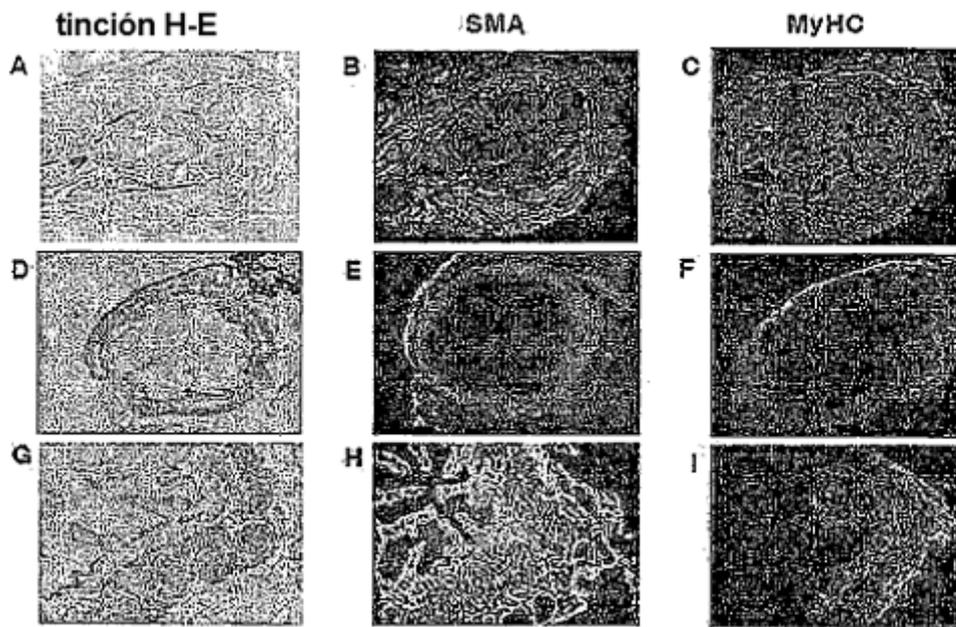


FIG. 20

