

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 253**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2011 E 11807097 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2594636**

54 Título: **Composición de medio de cultivo para cultivar células madre mesenquimales derivadas del amnios y método para cultivar células madre mesenquimales derivadas del amnios utilizando la misma**

30 Prioridad:

16.07.2010 KR 20100068959

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

21.01.2015

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;
KANG, SUNG KEUN;
SEO, JU YEON y
KIM, HYOEUN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 527 253 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

Composición de medio de cultivo para cultivar células madre mesenquimales derivadas del amnios y método para cultivar células madre mesenquimales derivadas del amnios utilizando la misma.

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un medio para cultivar células madre mesenquimales, y más particularmente a una composición de medio para cultivar células madre mesenquimales, que contiene medio basal, ácido L-ascórbico 2-fosfato, suero fetal bovino, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b- FGF), aminoácidos no esenciales (NEAAs - siglas en inglés), insulina, N-acetil-L-cisteína, cloruro de calcio e hidrocortisona según se define en las reivindicaciones, y a un método de cultivar células madre mesenquimales utilizando la misma.

10 TÉCNICA DE ANTECEDENTES

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

15 Células madre adultas se obtienen tomando células de diversos órganos humanos y desarrollando las células en células madre y se caracterizan por que se diferencian en tejidos específicos solamente. Sin embargo, recientemente, experimentos para la diferenciación de células madre adultas en diversos tejidos, incluyendo células del hígado, fueron drásticamente un éxito, lo cual entra en un foco de atención.

Células madre multipotentes fueron aisladas primero de la médula ósea de adultos (Y. Jiang et al., *Nature*, 418:41, 2002), y luego se encontraron también en otros varios tejidos adultos (C.M. Verfaillie, *Trends Cell Biol.*, 12:502, 2002). En otras palabras, la médula ósea es la fuente de células madre más ampliamente conocida, también se encuentran células madre multipotentes en la piel, vasos sanguíneos, músculos y cerebro (J.G. Toma 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 el tejido adulto 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 específicamente rastreados. Es decir, es muy difícil mantener las células madre aisladas *in vitro*. Mientras tanto, los resultados de estudios sobre el aislamiento de células madre mesenquimales de tejido fetal revelaron que hay abundantes células madre mesenquimales en el tejido fetal. Sin embargo, el uso de tejido fetal como fuente de agentes terapéuticos celulares ha sido limitado debido a consideraciones éticas. Células madre mesenquimales también fueron aisladas de sangre de cordón umbilical (UCB - siglas en inglés) como fuente de células madre mesenquimales fetales (MSCs - siglas en inglés), pero sus números eran muy pequeños, y mostraron una proliferación deficiente.

En los últimos años, se sabe que células madre mesenquimales están presentes en el amnios (membrana amniótica o membrana de revestimiento amniótico), es decir, el delgado saco de la membrana más interna que rodea la placenta y a un embrión de mamífero en desarrollo. Por lo tanto, se han desarrollado tecnologías para aislar y cultivar este tipo de células madre mesenquimales (Publicación de patente internacional PCT N° WO 2006/019357, Patentes de Corea N°s de Registro 0795708 y 0818214).

El documento WO 2005/085422 describe un medio de cultivo para células madre humanas adultas que comprende calcio, NAC, hidrocortisona, insulina, EGF, suero fetal bovino al 10% y un antioxidante (reivindicaciones 74, 86). El antioxidante puede ser A2P (reivindicación 79). D1 describe, por lo tanto, una composición del medio que comprende todos los aditivos requeridos en la reivindicación 1, excepto bFGF y NEAAs. El medio se ha de utilizar para células madre adultas, incluidas células madre mesenquimales (p. ej., reivindicación 54). El mismo medio también se describe en Lin et al., *Stem cells and Development* 14, 92-102 (2005).

El documento WO 2009/061024 también muestra una composición de medio que comprende FBS, ácido ascórbico, hidrocortisona, NAC e insulina, para uso en el cultivo de células madre adultas procedentes del amnios (pág. 12, líneas 4-9). D2 describe otra composición de medio (pág. 12, líneas 1-4) que comprende DMEM, ácido ascórbico, EGF y NEAAs (pero no hidrocortisona ni NAC).

Sin embargo, los métodos convencionales para el cultivo de células madre derivadas de amnios tienen unas limitaciones, debido a que el tiempo necesario para que las células madre proliferen es largo.

5 Por consiguiente, los autores de la presente invención han hecho grandes esfuerzos para desarrollar un método capaz de aumentar la tasa de proliferación de células madre derivadas del amnios, manteniendo al mismo tiempo la capacidad de diferenciarse y, como resultado, han encontrado que, cuando células madre derivadas del amnios se cultivan en un medio que contiene DMEM-P y KSFM-P, la capacidad de las células de proliferar se puede aumentar al tiempo que se mantiene la capacidad de diferenciarse, completando así la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

PROBLEMA TÉCNICO

Es un objeto de la presente invención proporcionar un medio para cultivar células madre mesenquimales que muestre una alta tasa de proliferación celular al tiempo que mantenga la capacidad de las células de diferenciarse.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de cultivar células madre mesenquimales utilizando el medio anterior.

SOLUCIÓN TÉCNICA

Para conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona una composición de medio para el cultivo de células madre mesenquimales, comprendiendo el medio:

15 (i) DMEM-P que contiene DMEM-HG, 0,2 mM de ácido L-ascórbico 2-fosfato, suero fetal bovino al 10%, 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), 10 µl/ml de aminoácido no esencial (NEAA); y

(ii) KSFM-P que contiene Queratinocitos-SFM definidos, 0,2 mM de ácido L-ascórbico 2-fosfato, 5 µg/ml de insulina, 2 mM de N-acetil-L-cisteína, 0,09 mM de cloruro de calcio, 74 ng/ml de hidrocortisona, suero fetal de bovino al 5%,

20 en donde el aminoácido no esencial (NEAA) consiste en 750 mg/L de glicina, 890 mg/L de L-alanina, 1.320 mg/L de L-asparagina, 1.330 mg/L de ácido L-aspártico, 1.470 mg/L de ácido L-glutámico, 1.150 mg/L de L-prolina y 1.050 mg/L de L-serina, y la relación en volumen de DMEM-P : KSFM-P es 2:1, 1:1 o 1:3.

La presente invención también proporciona un método para cultivar células madre mesenquimales, comprendiendo el método cultivar las células madre mesenquimales en la composición del medio anterior.

25 Otras características y realizaciones de la presente invención resultarán más evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas y las reivindicaciones adjuntas

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 muestra fotografías de células madre mesenquimales derivadas de amnios, cultivadas en DMEM-P, KSFM-P o un medio mixto de DMEM-P y KSFM-P durante 3 días.

30 FIG. 2 muestra fotografías de células madre mesenquimales derivadas de amnios, cultivadas en DMEM-P, KSFM-P o un medio mixto de DMEM-P y KSFM-P durante 4 días.

FIG. 3 muestra los resultados de análisis de citometría de flujo de cada uno de los grupos para CD31.

FIG. 4 muestra los resultados de análisis de citometría de flujo de cada uno de los grupos para CD34.

FIG. 5 muestra los resultados de análisis de citometría de flujo de cada uno de los grupos para CD45.

35 FIG. 6 muestra los resultados de análisis de citometría de flujo de cada uno de los grupos para CD29.

FIG. 7 muestra los resultados de análisis de citometría de flujo de cada uno de los grupos para CD44.

FIG. 8 muestra los resultados de citometría de flujo en cada uno de los grupos para CD73.

FIG. 9 es un conjunto de fotografías que muestran células madre mesenquimales de amnios, cultivadas en un medio mixto de DMEM-P y KSFM-P (Grupo 2) en el paso 1 (P1).

FIG. 10 es un conjunto de fotografías que muestran células madre mesenquimales de amnios, cultivadas en un medio mixto de DMEM-P y KSFM-P (Grupo 2) en el paso 2 (P2).

5 FIG. 11 muestra los resultados de analizar la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales de amnios, cultivadas en un medio mixto de DMEM-P y KSFM-P (Grupo 2), utilizando tinción de rojo de alizarina S en diversas condiciones.

FIG. 12 es un gráfico que muestra una comparación entre la concentración cuantificada de rojo de alizarina S en células madre mesenquimales derivadas de amnios, cultivadas en DMEM-P o un medio mixto (Grupo 2) y diferenciadas en células de huesos en diversas condiciones, y las de un control grupo (cuya diferenciación osteogénica no fue inducida).

10 MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención está dirigida a una composición de medio para el cultivo de células madre mesenquimales, que contiene:

(i) DMEM-P que contiene DMEM-HG, 0,2 mM de ácido L-ascórbico 2-fosfato, suero fetal bovino al 10%, 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), 10 µl/ml de aminoácido no esencial (NEAA); y

15 (ii) KSFM-P que contiene Queratinocitos-SFM definidos, 0,2 mM de ácido L-ascórbico 2-fosfato, 5 µg/ml de insulina, 2 mM de N-acetil-L-cisteína, 0,09 mM de cloruro de calcio, 74 ng/ml de hidrocortisona, suero fetal de bovino al 5%,

20 en donde el aminoácido no esencial (NEAA) consiste en 750 mg/L de glicina, 890 mg/L de L-alanina, 1.320 mg/L de L-asparagina, 1.330 mg/L de ácido L-aspártico, 1.470 mg/L de ácido L-glutámico, 1.150 mg/L de L-prolina y 1.050 mg/L de L-serina, y la relación en volumen de DMEM-P : KSFM-P es 1:0,5-3.

En la presente invención, las células madre mesenquimales pueden derivarse de amnios.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un método para cultivar células madre mesenquimales, comprendiendo el método cultivar las células madre mesenquimales en la composición de medio anterior.

En la presente invención, las células madre mesenquimales pueden derivarse de amnios.

25 Células madre mesenquimales derivadas de amnios, utilizadas en un ejemplo de la presente invención, no son de diversos tipos de células extraídas de todo el amnios aislado de la placenta, sino que son sólo células madre mesenquimales derivadas de amnios.

30 En un ejemplo de la presente invención, con respecto a un método para aislar células madre mesenquimales derivadas de amnios, tejido de amnios se aisló de tejido de la placenta recogido durante el parto, y el tejido de amnios aislado se lavó con solución salina estéril y se cortó lo más fino posible con tijeras quirúrgicas. Se añadió una disolución de colagenasa y se mezcló bien con el tejido finamente cortado. La mezcla se colocó en un matraz que después se incubó en una incubadora de 5% de CO₂ a 37°C durante 90 minutos para lisar el tejido. El tejido lisado se filtró a través de un filtro de células y se centrifugó. Después de la centrifugación, se retiró el sobrenadante y el precipitado de células se suspendió en DMEM-P y se inoculó en un matraz T, que después se incubó en una incubadora de 5% de CO₂ a 37°C durante 3-4 días. Luego sólo se recogieron las células madre mesenquimales adheridas al matraz de cultivo.

40 En un ejemplo de la presente invención, células madre mesenquimales derivadas de amnios mostraron una elevada tasa de proliferación de las células en un medio mixto de DMEM-P y KSFM-P que en DMEM-P o KSFM-P solo. Particularmente, células madre mesenquimales derivadas de amnios mostraron la más alta tasa de proliferación en un medio que consistía en DMEM-P-P y KSFM-P mezclado en una relación de 66:33.

EJEMPLOS

En lo que sigue se describirá con mayor detalle la presente invención con referencia a ejemplos. Resultará obvio para una persona que tenga experiencia ordinaria en la técnica que estos ejemplos son con fines ilustrativos solamente y no deben interpretarse que limiten el alcance de la presente invención.

45 **Ejemplo 1: Aislamiento de células madre mesenquimales a partir de tejido de amnios**

Tejido de amnios utilizado en el ejemplo de la presente invención se aisló de la placenta, y el tejido aislado se colocó en una solución salina que contiene antibiótico o medio DMEM (medio de Dulbecco modificado por Eagle) y luego se transfirió al laboratorio.

5 En un banco limpio se lavaron 5 g de tejido de amnios con solución salina estéril, y en una placa de Petri el tejido de amnios lavado se cortó lo más fino posible con tijeras quirúrgicas. Se añadió una disolución de colagenasa y se mezcló bien con el tejido finamente cortado. La mezcla se colocó en un matraz que después se incubó en una incubadora de 5% de CO₂ a 37°C durante 90 minutos para lisar el tejido. El tejido lisado se filtró a través de un filtro de células en un tubo de 50 mL y se centrifugó. Después de la centrifugación, se retiró el sobrenadante y el precipitado de células se suspendió en DMEM-P y se inoculó en un matraz T, que después se incubó en una incubadora de 5 de CO₂ a 37°C durante 3-4 días. Luego sólo se recogieron las células madre mesenquimales adheridas al matraz de cultivo.

Ejemplo 2: Cultivo de células madre mesenquimales de amnios aisladas en medio mixto de DMEM-P y KSFM-P

15 Las células madre mesenquimales derivadas de amnios obtenidas en el Ejemplo 1 se dispensaron en un matraz T175 a una densidad de $1,0 \times 10^6$ células y se cultivaron en medios mixtos consistentes en medio DMEM-P (Tabla 1) y medio KSFM-P (Tabla 3) mezclados en las relaciones que se muestran en la Tabla 4, mientras que los medios fueron reemplazados a intervalos de 2 días. En las Figs. 1 y 2 se muestran fotografías de células tomadas a los 3 días y 4 días de cultivo.

Tabla 1: Componentes del medio DMEM-P

20

Componentes	Fuente de adquisición	Concentración
DMEM-HG	WeIGENE, Inc.	
Ácido L-ascórbico 2-fosfato	Sigma-Aldrich	0,2 mM
Suero fetal bovino	Invitrogen	10%
b-FGF	Invitrogen	10 ng/ml
NEAA	Invitrogen	10 µl/ml

Tabla 2: Composición de NEAA

Componentes de NEAA	Concentración (mg/L)
Glicina	750
L-alanina	890
L-asparagina	1.320
Ácido L-aspartico	1.330
Ácido L-glutámico	1.470
L-prolina	1.150
L-serina	1.050

Tabla 3: Componentes del medio KSFM-P

Componentes	Fuente de adquisición	Concentración
Queratinocitos-SFM definidos	Invitrogen	
Ácido L-ascórbico 2-fosfato	Sigma-Aldrich	0,2 mM
Insulina	Millipore	5 µg/ml
N-acetil-L-cisteína	Sigma-Aldrich	2 mM
Cloruro cálcico	Sigma-Aldrich	0,09 mM
Hidrocortisona	Sigma-Aldrich	74 ng/ml
Suero fetal bovino	Invitrogen	5%

5 Tabla 4: Relación de mezcla de DMEM-P y KSFM-P

Grupos	DMEM-P	KSFM-P
1	100	0
2	66	33
3	50	50
4	25	75
5	0	100

10 A los 4 días de cultivo, las células madre mesenquimales derivadas de amnios se lavaron con tampón HBSS, y después se incubaron en TrypLE-Express (Gibco) o tripsina-EDTA al 0,25% a 37°C durante 10 minutos. A ello se añadió medio que contiene FBS para inactivar la tripsina, y luego se contó el número de células madre mesenquimales derivadas de amnios resultantes.

 Como resultado, como se puede ver en la Tabla 4 y en las FIGS. 1 y 2, las células madre derivadas de amnios crecieron mucho más rápido en un medio mixto de medio DMEM-P y medio KSFM-P que en medio DMEM-P o medio KSFM-P solo, y el número de las células a los 4 días de cultivo también era significativamente mayor cuando las células se cultivaron en el medio mixto de medio DMEM-P y medio KSFM-P.

15 Como se muestra en la Tabla 5 que figura a continuación, un medio de Grupo 2 que consistía en medio DMEM-P y medio KSFM-P mezclado en una relación de 66:33 mostró la tasa de proliferación celular más alta. Por lo tanto, se utilizó el medio mixto de Grupo 2 en subcultivo.

20

Tabla 5: Cambio en el número de células como una función de la relación de mezcla de los medios

Grupos	DEM-P : KSFM-P	El número de células
1	100 : 0	$1,2 \times 10^7$
2	66 : 33	$3,7 \times 10^7$
3	50 : 50	$2,4 \times 10^7$
4	25 : 75	$2,0 \times 10^7$
5	0 : 100	$1,4 \times 10^7$

Ejemplo 3: Características inmunológicas de células madre mesenquimales derivadas de amnios cultivadas en medio mixto

Análisis de citometría de flujo de la expresión de antígeno de superficie

Las células madre mesenquimales derivadas de amnios, cultivadas en cultivo mixto en el Ejemplo 2, se caracterizaron con marcadores de antígenos de la serie CD. Análisis FACS se realizaron utilizando CD29 (marcador de células mononucleares), CD31 (marcador de células endoteliales y de células madre), CD34 (marcador de células madre hematopoyéticas), CD44, CD45 (PTPR, ASV, marcador de leucocitos) y CD73.

Las células madre mesenquimales derivadas de amnios, obtenidas en el Ejemplo 1, se lavaron con PBS y se trataron con tripsina, después de lo cual las células se recogieron y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, y las células se incubaron en una disolución tampón de bloqueo (suero (suero normal de cabra + suero normal de caballo) al 5%) a 4°C durante 60 minutos, seguido de centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Después de haber retirado el sobrenadante, las células se suspendieron en PBS y se dispensaron en cada uno de los pocillos a una densidad de 1×10^5 células correspondientes al número de marcadores de control negativo y de antígeno CD. Anticuerpo monoclonal anti-humano de ratón conjugado con R-ficoeritrina (PE)/FITC (isotiocianato de fluoresceína) se añadió a cada uno de los pocillos y se incubó a 4°C durante 40 minutos, seguido de centrifugación a 1500 rpm durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Después se repitió una vez más el proceso de retirar el sobrenadante, lavar las células con PBS y centrifugar las células a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de haber retirado el sobrenadante, las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo.

Como resultado, las células madre mesenquimales derivadas de amnios de cada uno de los grupos eran todas inmunológicamente positivas para CD29, CD44 y CD73 e inmunológicamente negativas para CD31, CD34 y CD45 (véanse las FIGS. 3 a 8).

Ejemplo 4: Comparación de la capacidad de proliferación entre células madre mesenquimales derivadas de amnios subcultivadas en medio mixto

Las células cultivadas en el Ejemplo 1 se subcultivaron a una concentración de $1,0 \times 10^6$ células/ matraz T175, y se examinaron las capacidades de proliferar de las células de paso 1 (P1) y de paso (P2).

El subcultivo se realizó bajo las mismas condiciones que las del Ejemplo 1.

Como resultado, se midió que las células P1 del grupo cultivado en medio DMEM-P solo (Grupo 1) eran $5,4 \times 10^6$ células después de 5 días de cultivo, mientras que se midió que las células P1 del grupo cultivado en el medio mixto de DMEM-P y KSFM-P (66:33) (Grupo 2) eran $1,25 \times 10^7$ células después de 4 días de cultivo, lo que sugiere que las células mostraron una capacidad significativamente alta de proliferar en el medio mixto (véase la FIG. 9).

Se midió que las células P2 del grupo cultivado en medio DMEM-P solo (Grupo 1) eran $3,4 \times 10^6$ células después de 4 días de cultivo y, por lo tanto, el número de las células proliferadas disminuyó en comparación con el número de

las células P1. Sin embargo, se midió que las células P2 del grupo cultivado en el medio mixto de DMEM-P y KSFM-P (66:33) (Grupo 2) eran $1,38 \times 10^7$ células después de 4 días de cultivo y, por lo tanto, el número de las células P2 aumentó en comparación con las células P1 (véase la FIG. 10).

Ejemplo 5: Comparación de características inmunológicas entre células madre mesenquimales derivadas de amnios subcultivados en medio mixto

De la misma manera que en el Ejemplo 2, células P1 y P2 se obtuvieron mediante subcultivo utilizando cada uno de medio DMEM-P solo y un medio mixto de DMEM-P y KSFM-P (66:33). Se examinaron las características inmunológicas de las células P1 y P2, y como resultado, las células madre mesenquimales derivadas de amnios de cada uno de los grupos eran todas inmunológicamente positivas para CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y HLA-ABC, e inmunológicamente negativas para CD31, CD34, CD45 y HLA-DR.

Ejemplo 6: Cuantificación de la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales derivadas de amnios cultivadas en medio mixto

Las células madre mesenquimales derivadas de amnios cultivadas en cada uno de medio DMEM-P solo y el medio mixto de DMEM-P/KSFM-P en el Ejemplo 1 se cultivaron en medio de inducción de la osteogénesis (medio OsteoDiff no hematopoyético, Miltenyi Biotec) durante 18 días (37°C; 5% de CO₂; ciclo de sustitución medio: 3-4 días) para inducir la diferenciación en células de los huesos, y el medio de diferenciación fue reemplazado por medio reciente a intervalos de 2 días. La diferenciación de las células madre mesenquimales derivadas de amnios en células óseas se realizó en cada uno de un estado de normoxia y un estado hipóxico (1-5%) en las condiciones mostradas en la Tabla 6 que figura a continuación.

A los 18 días después del inicio del cultivo, se confirmó mediante tinción con rojo de alizarina S que las células madre mesenquimales derivadas de amnios se diferenciaban en células osteogénicas. Además, las células cultivadas en el medio mixto (Grupo 2) se diferenciaban a una tasa mayor que las células cultivadas en medio DMEM-P solo, y las células (M-H-N) cultivadas en el estado hipóxico mostraron una mayor capacidad para diferenciarse (véanse las FIGS. 11 y 12).

Tabla 6

Condiciones de cultivo de P2		Condiciones de diferenciación de P3	DO ₄₀₅	Concentración de rojo de alizarina	Símbolos
Medios de cultivo	Incubación	Incubación			
DMEM-P	Normoxia	Normoxia	0,125	4,20712	P-N-N
	Normoxia	Hipoxia	0,45333	1,6289	P-N-H
	Hipoxia	Normoxia	0,134333	4,509159	P-H-N
Mezcla de DMEM-P + KSFM-P	Normoxia	Normoxia	0,164	5,469256	M-N-N
	Hipoxia	Normoxia	0,208	6,893204	M-H-N

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

De acuerdo con la presente invención, se puede obtener en un corto tiempo un cierto número de células madre mesenquimales requeridas para la terapia de células madre, y la capacidad de las células madre mesenquimales para diferenciarse se mejora de manera que sean útiles para la terapia de células madre de la presente invención. Por lo tanto, el alcance sustancial de la presente invención será definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de medio para el cultivo de células madre mesenquimales, comprendiendo el medio:

(i) DMEM-P que contiene DMEM-HG, 0,2 mM de ácido L-ascórbico 2-fosfato, suero fetal bovino al 10%, 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), 10 µl/ml de aminoácido no esencial (NEAA); y

5 (ii) KSFM-P que contiene Queratinocitos-SFM definidos, 0,2 mM de ácido L-ascórbico 2-fosfato, 5 µg/ml de insulina, 2 mM de N-acetil-L-cisteína, 0,09 mM de cloruro de calcio, 74 ng/ml de hidrocortisona, suero fetal de bovino al 5%,

10 en donde el aminoácido no esencial (NEAA) consiste en 750 mg/L de glicina, 890 mg/L de L-alanina, 1.320 mg/L de L-asparagina, 1.330 mg/L de ácido L-aspártico, 1.470 mg/L de ácido L-glutámico, 1.150 mg/L de L-prolina y 1.050 mg/L de L-serina, y la relación en volumen de DMEM-P : KSFM-P es 2:1, 1:1 o 1:3.

2. La composición de medio de la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales se derivan del amnios.

3. Un método para cultivar células madre mesenquimales, comprendiendo el método cultivar las células madre mesenquimales en la composición de medio de la reivindicación 1.

15 4. El método de la reivindicación 3, en el que las células madre mesenquimales se derivan del amnios.

FIG. 1

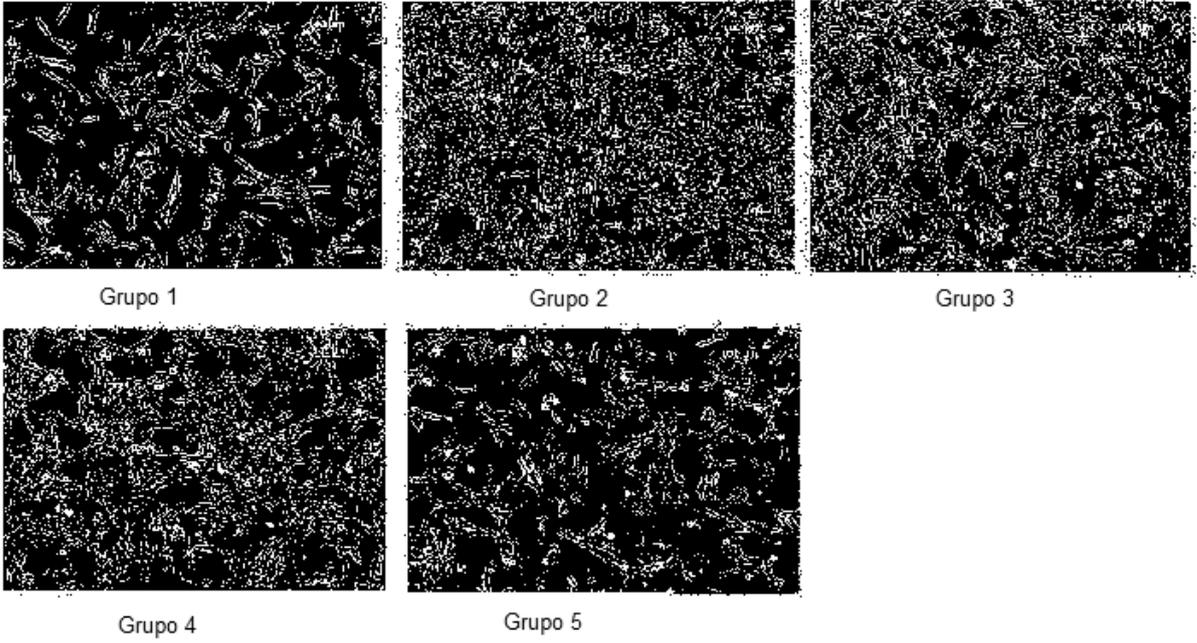


FIG. 2

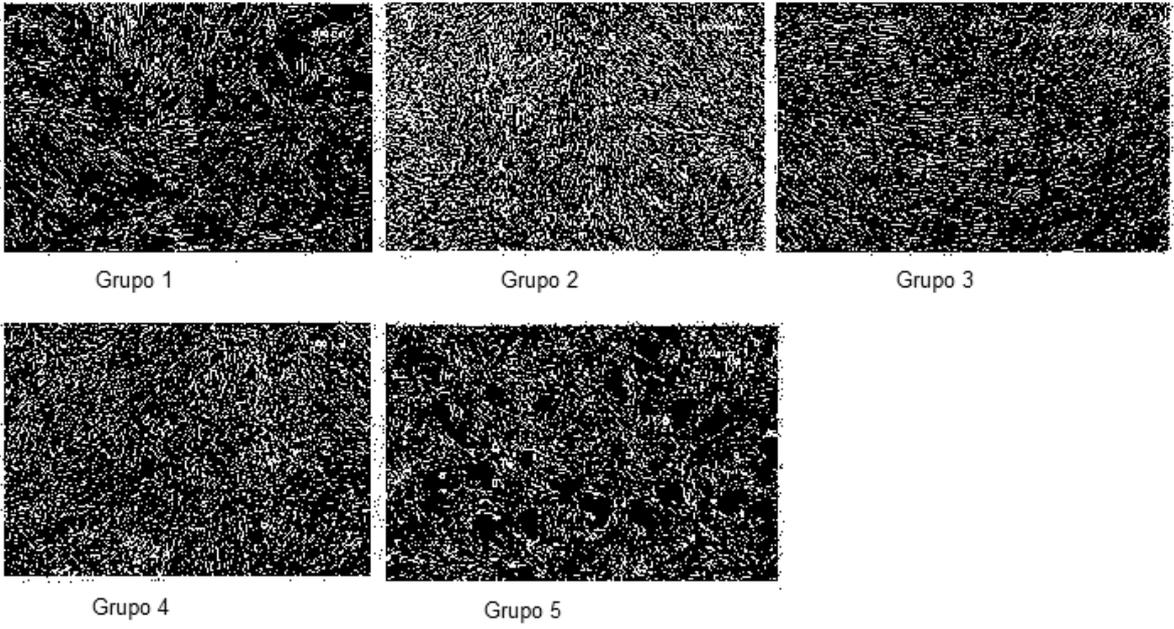


FIG. 3

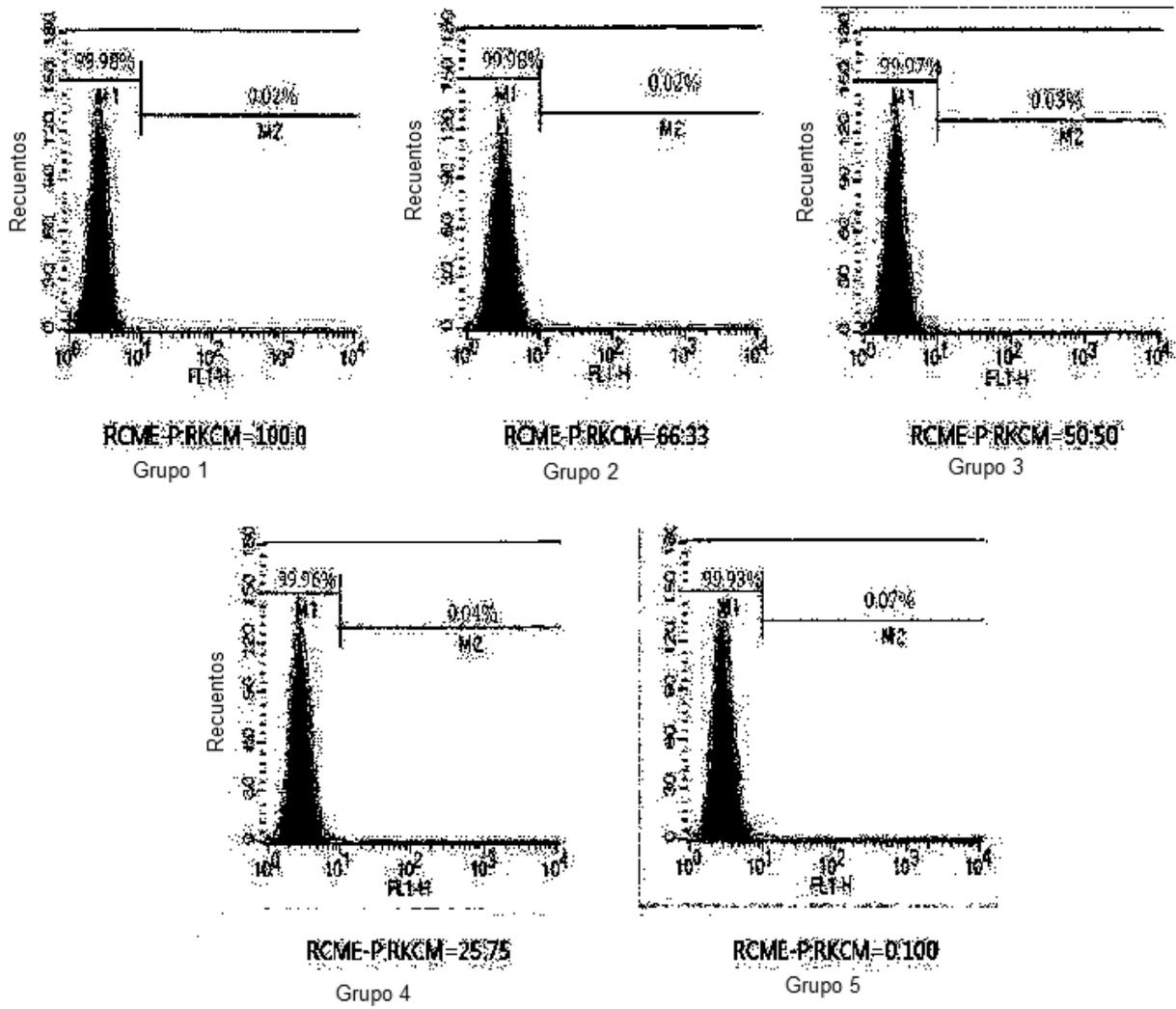


FIG. 4

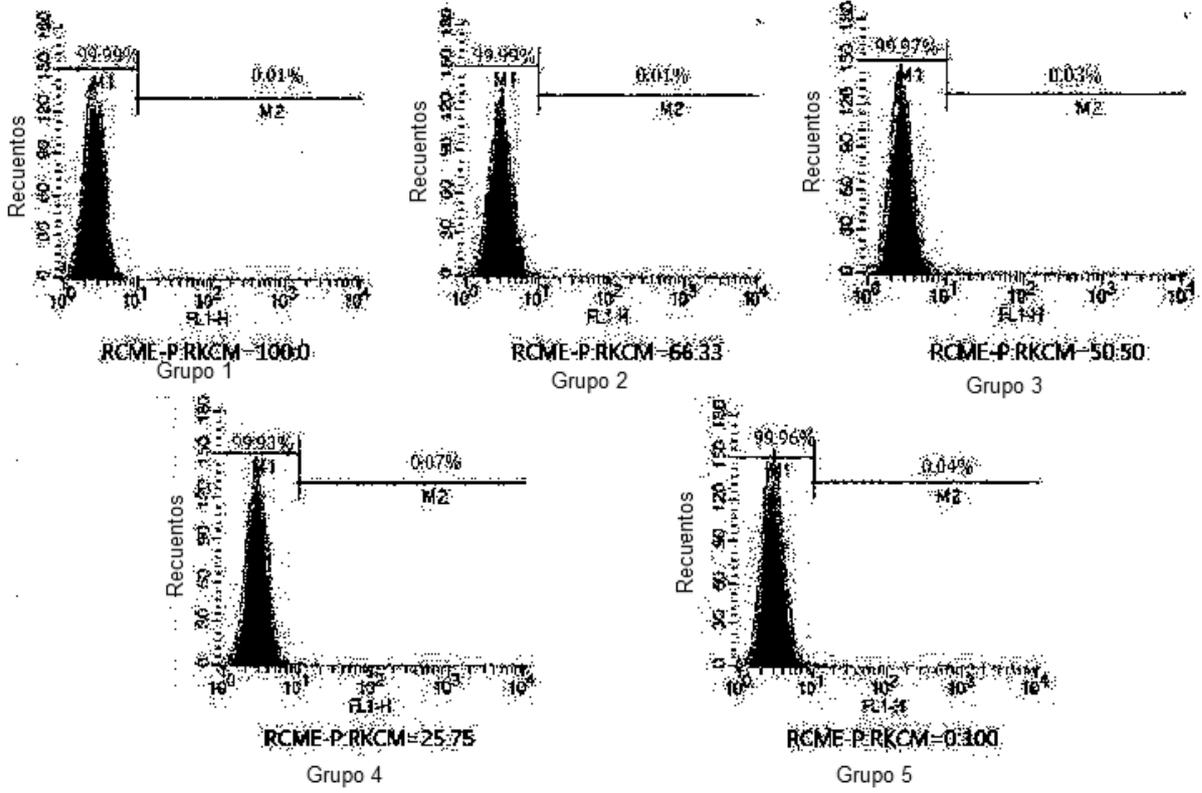


FIG. 5

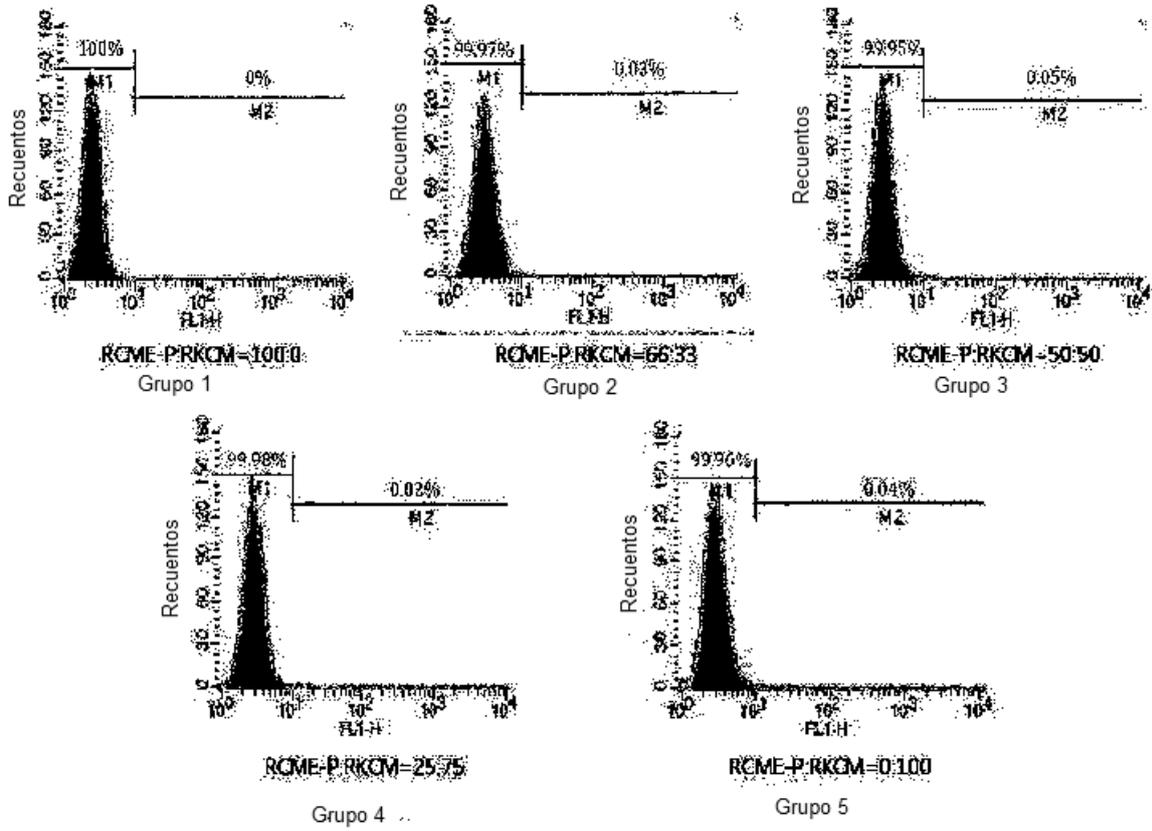


FIG. 6

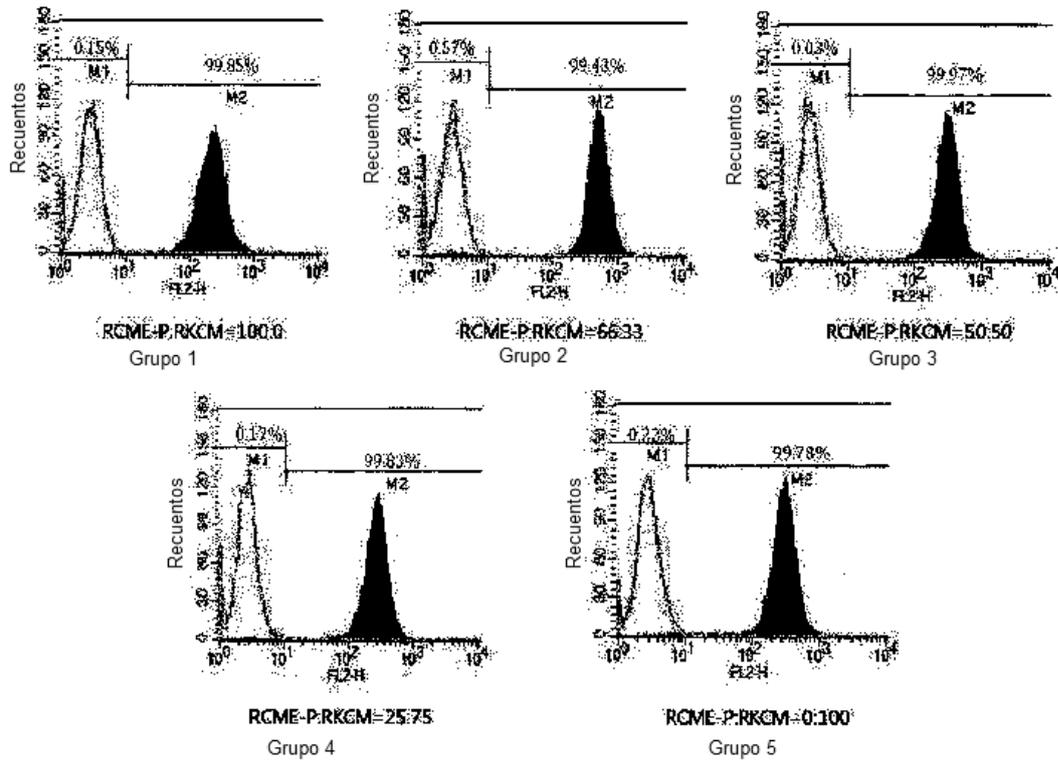


FIG. 7

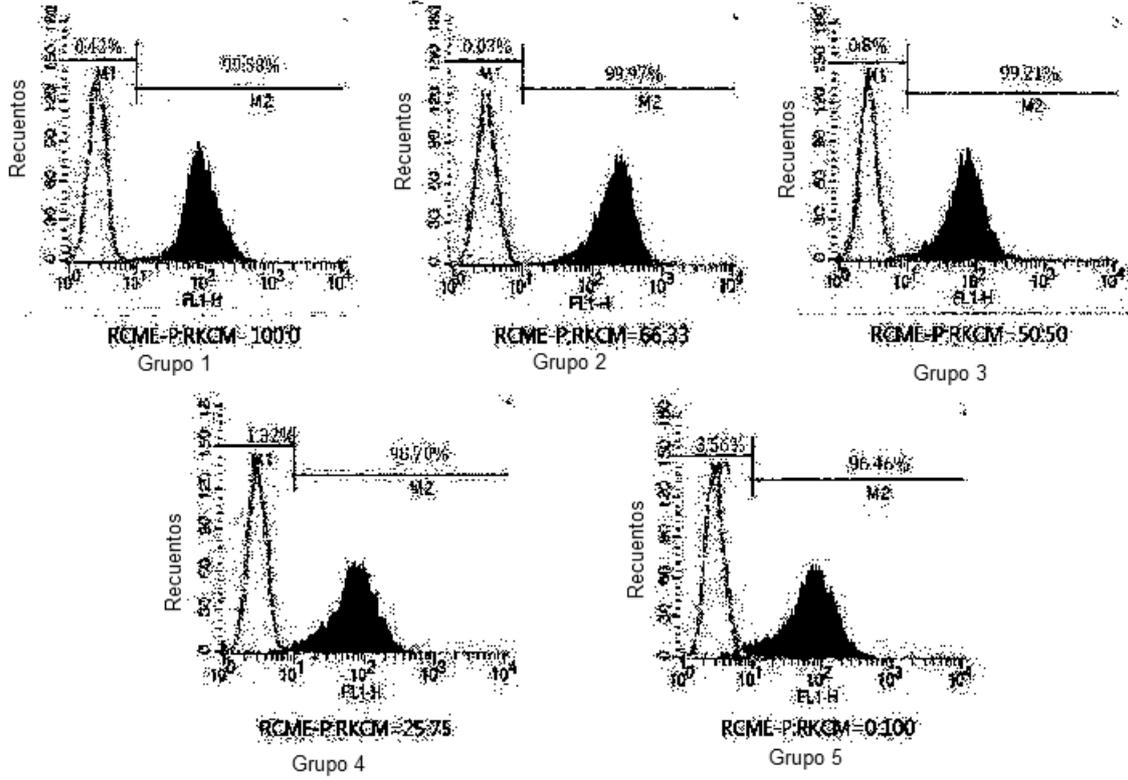


FIG. 8

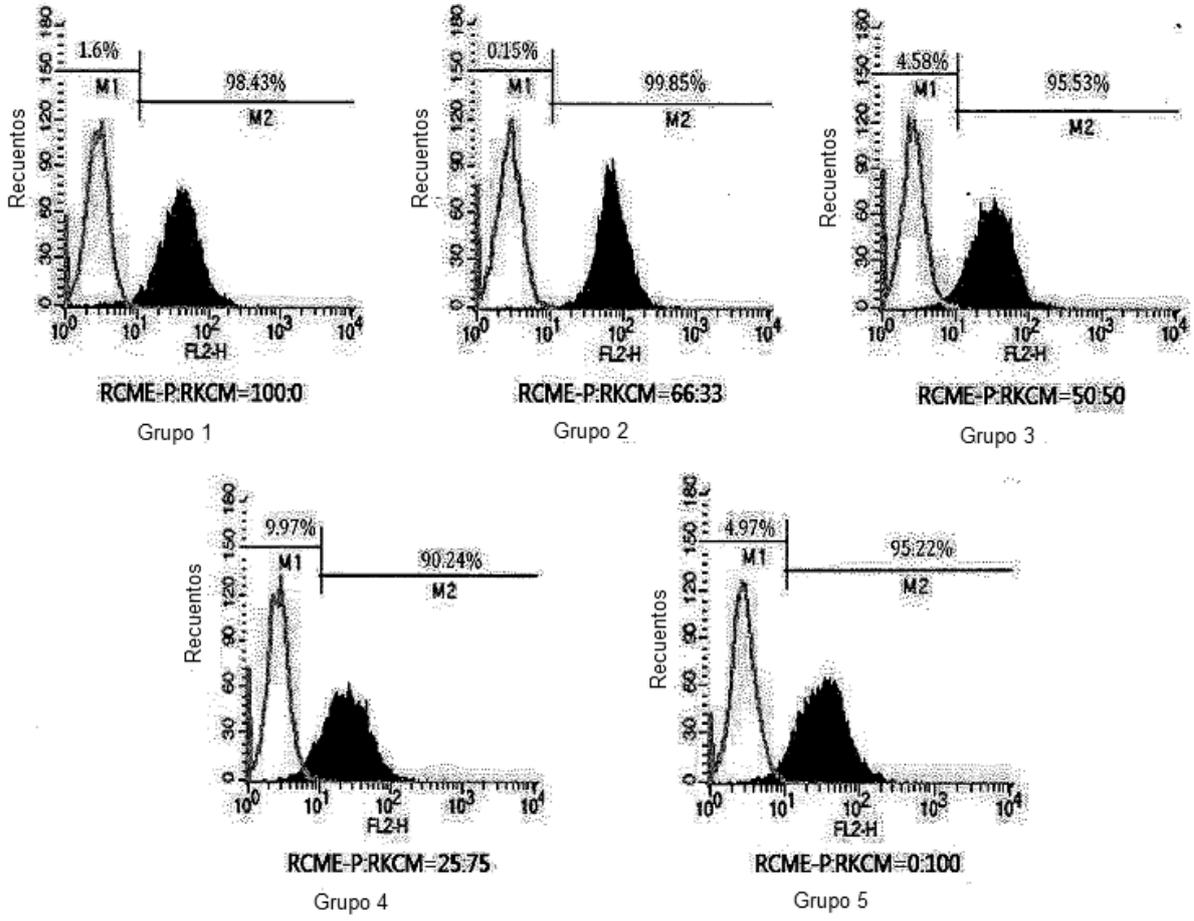
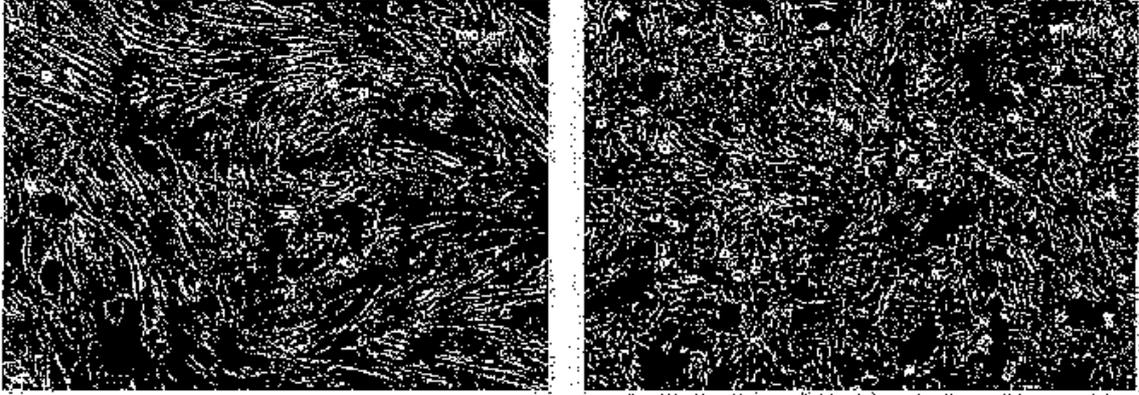


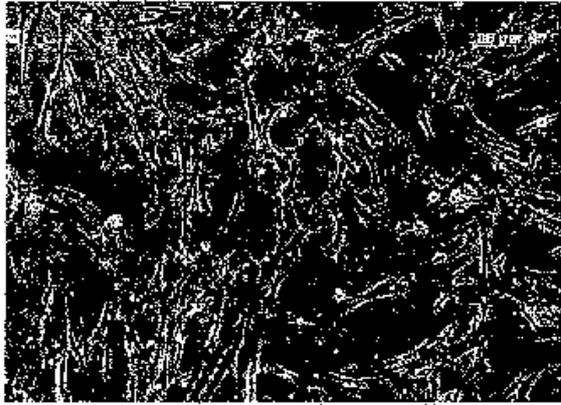
FIG. 9



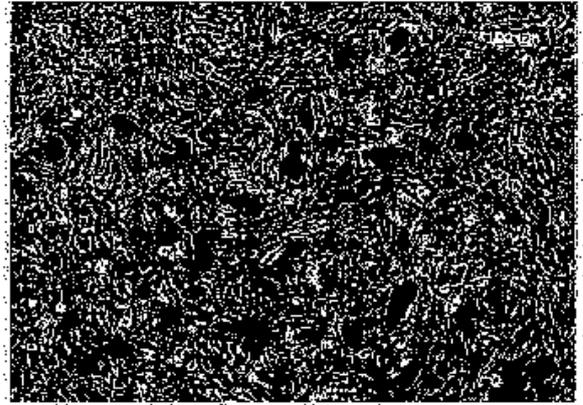
DMEM-P Solo (cultivo de 5 días)

Medio mixto (cultivo de 4 días)
(Grupo 2)

FIG. 10



DMEM-P Solo (cultivo de 5 días)



Medio mixto (cultivo de 4 días)
(Grupo 2)

FIG. 11

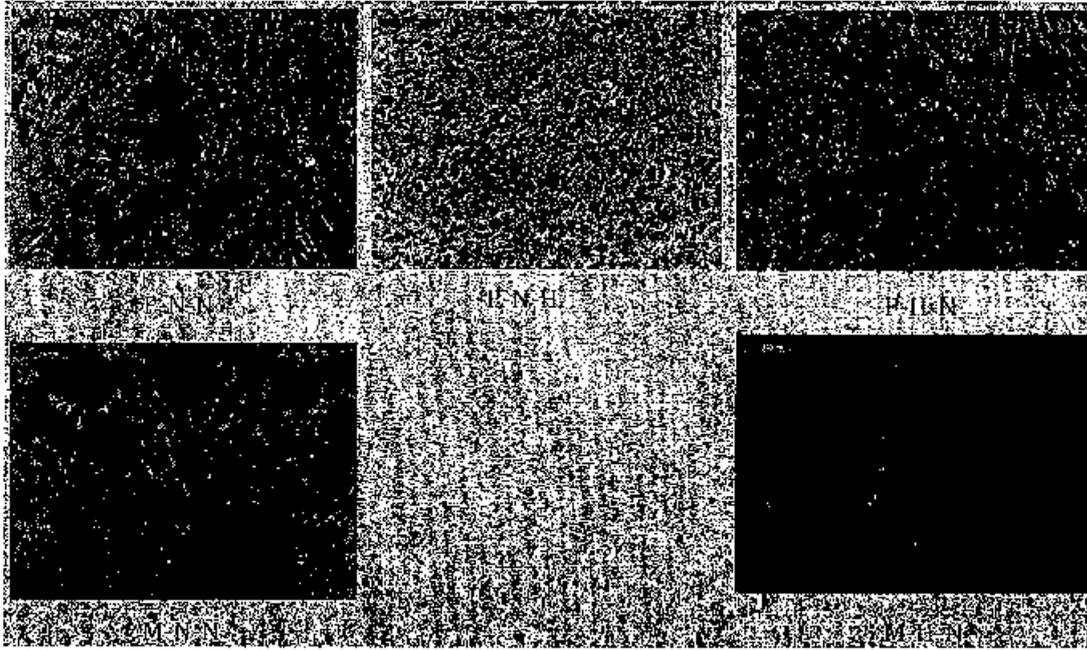


FIG. 12

