

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 235**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2010 E 10775119 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2431460**

54 Título: **TSP-1, TSP-2 e IL-17BR asociadas con la diferenciación de células madre**

30 Prioridad:

13.05.2009 KR 20090041753
29.05.2009 US 182484 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2016

73 Titular/es:

MEDIPOST, CO., LTD. (100.0%)
1571-17 Seocho-3dong, Seocho-gu
Seoul 137-874, KR

72 Inventor/es:

YANG, YOON-SUN;
OH, WON IL;
JEON, HONG BAE;
JUNG, MEE HYUN y
JEONG, SANG YOUNG

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 559 235 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

TSP-1, TSP-2 e IL-17BR asociadas con la diferenciación de células madre

5 **Campo técnico**

Una o más realizaciones de la presente invención se refieren a trombospondina 1 (TSP-1), TSP-2 y receptor de interleucina 17B (IL-17BR) asociados con la actividad de células madres, por ejemplo, actividad de una célula madre mesenquimal (MSC) y su uso.

10

Técnica antecedente

El cartílago es un tipo de tejido conectivo denso y espeso y está compuesto por condritos distribuidos en una matriz de tipo gel rígida pero algo flexible. El cartílago no contiene vasos sanguíneos y los nutrientes son suministrados mediante difusión a través de la matriz. El cartílago se clasifica en tres tipos: cartílago hialino (por ejemplo, cartílago de la nariz, tráquea y bronquiolos y cartílago articular), cartílago elástico (por ejemplo, cartílago del oído externo, parte de la trompa de Eustaquio y parte del cartílago laríngeo) y fibrocartílago (por ejemplo, cartílago del menisco y de placas terminales). La principal finalidad del cartílago es proporcionar un marco sobre el cual puede comenzar el depósito óseo y proporcionar una superficie blanda que permita un movimiento conexión entre huesos. Además, el cartílago proporciona un soporte fuerte y sin embargo flexible.

15

20

Hay diversas terapias para tratar una lesión de cartílagos o fallo de cartílagos. La osteoartritis es una artritis degenerativa que, en general, es relativamente leve al principio, pero se agrava con el tiempo y el desgaste. En términos de tratamiento médico, medicinas como un agente inflamatorio (por ejemplo, diclofenac, ibuprofeno, o naproxeno), un inhibidor selectivo de COX-2, hidrocortisona, glucosamina, y sulfato de condroitina se conoce que alivian el dolor debido a la pérdida de cartílago.

25

La trombospondina-2 (TSP-2) es una glicoproteína de matriz extracelular secretora que exhibe una fuerte actividad anti-angiogénica (Bornstein et al., 2000, Matrix Biology 19: 557-568).

30

La trombospondina-1 (TSP-1) es una glicoproteína multimérica compuesta por monómeros iguales. El monómero tiene un peso molecular de aproximadamente 185 kDa en electroforesis de gel de poliacrilamida y dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras. El multímero predominante es un trímero que tiene un peso molecular de aproximadamente 450 kDa en geles no reductores y los pesos moleculares por equilibrio de sedimentación son similares, a 135 kDa para monómeros y 420 kDa para trímeros. El peso molecular previsto de una secuencia de residuos de aminoácidos en el monómero es 127.524 Da, que no incluye las contribuciones de glicosidación y β -hidroxilación. La TSP-1 se conoce que está implicada en la adhesión, proliferación y quimiotaxis celular. Se ha descrito también que la TSP-1 puede estar implicada en el progreso de tumores malignos.

35

El receptor de interleucina-17B (IL-17BR) es una proteína en seres humanos que está codificada por el gen IL17BR. IL-17BR es un receptor de citoquinas que se une específicamente a IL17B e IL17E, pero no se une a IL17 ni IL17C.

40

El factor de crecimiento de factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) ejerce sus actividades biológicas uniéndose a una clase erb de receptores de EGF (EGFR). El HB-EGF se une a heparina con una elevada afinidad. El HB-EGF se une a EGFR para modular los efectos biológicos del factor de crecimiento sobre células diana, que incluyen desplazamiento y proliferación celular. El HB-EGF es mitogénico para fibroblastos, células de músculos lisos y células epiteliales. El HB-EGF es una proteína catiónica sensible al calor, con un peso molecular de aproximadamente 22.000 Da. El HB-EGF se conoce para tratar síntomas asociados con isquemia intestinal, por ejemplo, necrosis celular intestinal y enterocolitis. Además, el HB-EGF se conoce que inhibe las enfermedades hepáticas y la muerte de células hepáticas y facilita la regeneración hepática en mamíferos.

45

50

A pesar de estas descripciones, la asociación de la diferenciación condrogénica de células madre con TSP-1, TSP-2, IL-17BR y HB-EGF todavía no ha sido demostrada.

55 **Descripción detallada de la invención**

Problema técnico

Un aspecto de la presente invención proporciona trombospondina 1 (TSP-1), TSP-2 y receptor de interleucina 17B (IL-17BR) asociados con la actividad de células madre o una célula madre que la expresa.

60

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para usar TSP-1, TSP-2 e IL17BR asociados con una actividad de células madre o una célula madre que la expresa.

65 Solución técnica

La presente invención describe una composición para estimular que una célula se diferencie en forma de un condrocito, incluyendo la composición al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en trombospondina 2 (TSP-2) y una célula que expresa TSP-2.

5 La TSP-2 es una glicoproteína de matriz extracelular secretora que exhibe una fuerte actividad anti-angiogénica (Bornstein et al., 2000, Matrix Biology 19: 557-568). La TSP-2 es una glicoproteína de homotrímero conectada a disulfuro y, en seres humanos, es codificada por el gen THBS2. La TSP-2 puede tener una secuencia de aminoácidos descrita en (Bornstein et al., 2000, Matrix Biology 19: 557-568) o una secuencia derivada de la misma.

10 La composición puede incluir adicionalmente un portador que pueda ser farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el portador se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un medio, un tampón y un polímero biocompatible. El polímero biocompatible se puede seleccionar entre polímeros comúnmente usados que puedan soportar células y/o mantener la actividad celular en una estructura bi- o tri-dimensional. Por ejemplo, el polímero biocompatible puede incluir al menos un polímero seleccionado entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, hidroxí-apatita, quitosano, colágeno y fibrina.

15 La composición puede ser usada para prevenir una lesión, degeneración, pérdida o defecto de un cartílago. La lesión, degeneración, pérdida o defecto de cartílago puede incluir artritis o deformidad de articulaciones. La artritis puede ser artritis reumatoide o artritis degenerativa. Por ejemplo, la lesión, degeneración, pérdida o defecto del cartílago puede estar provocado por al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en artritis degenerativa debida a envejecimiento; artritis degenerativa temprana debida a sobrecarga de las articulaciones, incluida obesidad; lesiones externas debidas a deportes, caídas, accidentes y similares; artritis degenerativa desarrollada de forma secundaria por no tratar apropiadamente una lesión de cartílago debida a lesiones externas y deformidad de las articulaciones debida a lesión de ligamentos, debilidad muscular alrededor de las articulaciones, dislocación de las articulaciones, formación de ratones articulares y retraso del crecimiento óseo. Además, la célula que va a ser diferenciada en forma de un condrocito debe ser una célula derivada de al menos uno de los tejidos expuestos por una lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago, por ejemplo, tejidos como líquido sinovial, periostio, hueso y médula ósea.

20 La composición puede incluir TSP-2 en una cantidad que varía en el intervalo de aproximadamente 30 pg a aproximadamente 300 mg. Por ejemplo, la composición puede incluir TSP-2 en una cantidad que varía en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 1 μ m a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 300 mg o de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 300 mg.

25 Además, la composición puede incluir una célula que produce TSP-2 en una concentración que varía en el intervalo de aproximadamente 1×10^4 células/ml a aproximadamente 1×10^6 células/ml, de aproximadamente 5×10^4 células/ml a aproximadamente 1×10^6 células/ml, de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente 1×10^6 células/ml, o de aproximadamente 5×10^5 células/ml a aproximadamente 1×10^6 células/ml.

30 La composición puede facilitar la diferenciación condrogénica in vitro o in vivo. En el caso de facilitar la diferenciación condrogénica in vivo, un sujeto en el que se produce la diferenciación condrogénica puede ser un mamífero.

35 La célula puede ser una célula madre. La célula madre se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una célula madre pluripotente inducida (célula i-PS), una célula madre embrionaria y una célula madre adulta. La célula madre adulta se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una célula madre mesenquimal (MSC), una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula madre endotelial y una célula madre hematopoyética. La MSC puede ser derivada de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. La MSC puede incluir al menos uno seleccionado entre célula madre mesenquimal (UCB-MSC), una célula madre mesenquimal derivada de tejido adiposo (AD-MSC), una MSC derivada de saco vitelino embrionario, MSC derivada de placenta, una MSC derivada de la piel, una MSC derivada de sangre periférica, una MSC derivada de músculos, una MSC derivada del hígado, una MSC derivada de tejido nervioso, una MSC derivada del periostio, una MSC derivada del cordón umbilical, una MSC derivada de membrana fetal, una MSC derivada del tejido sinovial, una MSC derivada de membrana amniótica, una MSC derivada de menisco, una MSC derivada de ligamento cruzado anterior, una MSC derivada de condrocitos articulares y una SMC separada y/o cultivada a partir otros tejidos que incluyen MSCs.

40 La célula puede ser una célula que produce y secreta extracelularmente la TSP-2. Es decir, la célula en sí misma secreta TSP-2 e interacciona con la TSP-2 para ser diferenciada en forma de un condrocito. Además, la célula puede ser una célula que se pone en contacto con la TSP-2 que es producida por otras células para ser secretada o administrada externamente. Por ejemplo, la célula que se pone en contacto con TSP-2 puede ser una célula que existe en un tejido con una lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o un defecto de cartílago. La célula que existe en un tejido con la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago puede ser una célula que existe en un tejido expuesto debido a la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. El tejido expuesto puede variar dependiendo del grado de la lesión del cartílago, degeneración del cartílago, pérdida de cartílago o defecto del cartílago. El

- defecto se puede seleccionar entre el grupo que consiste en líquido sinovial, periostio, hueso y médula ósea. El tejido puede ser un tejido con artritis o deformidad de articulaciones. La artritis puede ser artritis reumatoide o artritis degenerativa. La célula que se pone en contacto con TSP-2 puede ser una célula derivada de al menos uno de los tejidos con artritis degenerativa debida a envejecimiento, artritis degenerativa temprana debida a sobrecarga de las articulaciones, incluida obesidad; lesiones externas debidas a deportes, caídas, accidentes y similares; artritis degenerativa secundariamente desarrollada por no tratar apropiadamente una lesión de cartílago debida a lesiones externas; y deformidad de las articulaciones debida a lesión de ligamentos, debilidad muscular alrededor de las articulaciones, dislocación de las articulaciones, formación de ratones articulares y retraso del crecimiento óseo.
- 5
- 10 La "célula que produce TSP-2" puede ser una célula que produzca naturalmente TSP-2 o una célula inducida a producir TSP-2. La composición puede incluir además un inductor que induzca que una célula produzca TSP-2.
- La célula que produce TSP-2 puede ser una célula madre. La célula madre se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una célula iPS, una célula madre embrionaria y una célula madre adulta. La célula madre adulta se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una MSC, una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula madre endotelial y una célula madre hematopoyética. La MSC puede ser derivada de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. La MSC puede incluir al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en una BM-MS, una UCB-MS, una AD-MS, una MSC derivada de saco vitelino embrionario, una MSC derivada de placenta, una SMSC derivada de la piel, una MSC derivada de sangre periférica, una MSC derivada de músculos, una MSC derivada del hígado, una MSC derivada de tejido nervioso, una MSC derivada del periostio, una MSC derivada de cordón umbilical, una MSC derivada de membrana fetal, una MSC derivada de tejido sinovial, una MSC derivada de membrana amniótica, una MSC derivada del menisco, una MSC derivada del ligamento cruzado anterior, una MSC derivada de condrocitos articulares y una MSC separada y/o cultivada de otros tejidos que incluyen MSCs.
- 15
- 20
- 25 La célula que produce TSP-2 y la célula para diferenciarse en forma de un condrocito pueden ser iguales o diferentes una de otra. Es decir, la célula que produce TSP-2 puede actuar mediante mecanismos paracrinos o autocrinos. La célula para diferenciarse en forma de un condrocito puede ser una célula que produce TSP-2 y secreta extracelularmente TSP-2. Es decir, la célula en sí misma secreta TSP-2 e interacciona con la TSP-2 secretada, diferenciándose así en forma de un condrocito. Además, la célula puede ser una célula que entra en contacto con TSP-2 que es producida por otras células para ser secretada o externamente administrada. Por ejemplo, la célula que entra en contacto con TSP-2 puede ser una célula que existe en un tejido con una lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o un defecto de cartílago. La célula que existe en un tejido con la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago puede ser una célula que existe en el propio tejido y tejido expuesto debido a la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. El tejido expuesto puede variar dependiendo del grado de la lesión del cartílago, degeneración del cartílago, pérdida de cartílago o defecto del cartílago. Por ejemplo, el tejido se puede seleccionar entre el grupo que consiste en líquido sinovial, periostio, hueso y médula ósea. El tejido puede ser un tejido con artritis o deformidad de articulaciones. La artritis puede ser artritis reumatoide o artritis degenerativa. La célula que entra en contacto con TSP-2 puede ser una célula derivada de al menos uno de los tejidos con artritis degenerativa debida a envejecimiento, artritis degenerativa temprana debida a sobrecarga de las articulaciones, incluida obesidad; lesiones externas debidas a deportes, caídas, accidentes y similares; artritis degenerativa secundariamente desarrollada por no tratar apropiadamente una lesión de cartílago debida a lesiones externas; y deformidad de las articulaciones debida a lesión de ligamentos, debilidad muscular alrededor de las articulaciones, dislocación de las articulaciones, formación de ratones articulares y retraso del crecimiento óseo.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50 La célula que produce TSP-2 puede ser una célula que expresa TSP-2 hasta una cantidad superior a un valor establecido. El valor establecido puede ser una cantidad expresada mediante una célula de referencia. La célula de referencia puede ser conocida por tener una capacidad de diferenciación condrogénica. Esta capacidad de diferenciación puede ser conocida por el hecho de que la célula de referencia es cultivada en un medio de diferenciación in vitro para inducir la diferenciación condrogénica. Además, la célula de referencia administrada a un sujeto se puede identificar que tiene una capacidad de diferenciación in vivo. La célula de referencia se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una BM-MS, un fibroblasto y UCB-MS. La UCB-MS se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una C5 UCB-MS, una C6 UCB-MS y una C7 UCB-MS.
- 55
- El valor de establecido puede ser al menos una cantidad expresada a partir de una MSC que se diferencia en forma de un condrocito en un medio de mantenimiento o en un medio de inducción y tiene una actividad baja. La MSC que se diferencia en forma de un condrocito y con una baja actividad puede ser una C5, C6 o C7 UCB-MS.
- 60
- El valor establecido puede ser $72 \text{ pg}/10^5$ células/ml o mayor cuando la célula que produce TSP-2 es cultivada en un medio de mantenimiento durante 1 día. Por otra parte, cuando la célula que produce TSP-2 es un sedimento cultivado en un medio de inducción durante 7 días, el valor de mantenimiento puede ser de $550 \text{ pg}/10^5$ células/ml o más.
- 65
- El valor establecido puede ser un valor de TSP-2 expresado en un medio seleccionado entre el grupo que consiste en un medio esencial mínimo α (MEM- α), un medio de mantenimiento de MSC (por ejemplo, un medio MEM- α que contiene 10% de suero bovino fetal (FBS) y $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina), un medio de diferenciación condrogénica de

una MSC (por ejemplo, un medio que contiene medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con elevado contenido de glucosa que contiene 4.500 mg/l de glucosa), 50 µg/ml de ascorbato, dexametasona 0,1 µM, 40 µg/ml de L-prolina, 100 µg/ml de piruvato, 10 ng/ml de TGF-β3, 500 ng/ml de proteína 6 morfogenética ósea (BMP-6), 50mg/ml ITS+, y 50 µg/ml de gentamicina).

5 La TSP-2 puede ser expresada en un lisado celular y/o una materia sobrenadante de cultivo. La concentración de la TSP-2 puede ser medida a un nivel de mRNA o nivel de proteínas.

10 La composición puede estimular la actividad de una célula para diferenciarse en forma de un condrocito. La célula puede ser igual o diferente de la célula que expresa TSP-2.

15 La célula puede ser una célula que produce TSP-2 y secreta extracelularmente la TSP-2. Es decir, la célula en sí misma secreta TSP-2 e interacciona con la TSP-2 para ser diferenciada en forma de un condrocito. Además, la célula puede ser una célula que entra en contacto con TSP-2 que es producida por otras células para ser secretada o externamente administrada. Por ejemplo, la célula que entra en contacto con TSP-2 puede ser una célula que existe en tejidos con lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. La célula que existe en un tejido con lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago puede ser una célula que existe en el propio tejido o un tejido expuesto debido a la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. El tejido expuesto puede variar dependiendo de un grado de la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. El tejido se puede seleccionar entre el grupo que consiste en líquido sinovial, periostio, hueso y médula ósea. El tejido puede ser un tejido con artritis o deformidad de articulaciones. La artritis puede ser artritis reumatoide o artritis degenerativa. La célula que entra en contacto con TSP-2 puede ser una célula derivada de al menos uno de los tejidos con artritis degenerativa debida a envejecimiento; artritis degenerativa temprana debida a sobrecarga de las articulaciones que incluye obesidad; lesiones externas debidas a deportes, caídas, accidentes y similares; artritis degenerativa secundariamente desarrollada por no tratar apropiadamente una lesión de cartílago debido a lesiones externas; y deformidad de las articulaciones debida a lesiones de ligamientos, debilidad muscular alrededor de las articulaciones, dislocación de articulaciones, formación de ratones articulares y retraso del crecimiento óseo. Por ejemplo, la célula puede estar colocada en las proximidades de la célula que expresa TSP-2.

20 La presente invención describe un método para diferenciar una célula en forma de un condrocito en un sujeto, incluyendo el método de administrar una composición que incluye al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-2 y células que expresan TSP-2 hasta una cantidad suficientemente eficaz para diferenciar una célula en forma de un condrocito.

25 La cantidad suficientemente eficaz para diferenciar una célula en forma de un condrocito puede ser una cantidad suficiente a una relación constante que permita la diferenciación condrogénica de una célula. La cantidad puede ser fácilmente seleccionada por los expertos en la técnica según la célula seleccionada y una célula que expresa TSP-2. Por ejemplo, la cantidad puede ser una cantidad que permita que al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de una célula madre total se diferencie en forma de un condrocito en 1 a 7 días. Una descripción detallada de la célula que expresa TSP-2 y la célula que se diferencia en forma de un condrocito ha sido ya proporcionada. El sujeto puede ser seleccionado entre el grupo que consiste en mamíferos, por ejemplo, un ser humano, un ratón y un conejo.

30 Según la presente invención, se proporciona un método para identificar una capacidad de una célula madre para diferenciar una célula en forma de un condrocito, incluyendo el método: cultivar una célula madre en un medio; medir la concentración de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2 y receptor de interleucina 17B (IL-17BR) del cultivo; e identificar una capacidad de diferenciación y/o inducción condrogénica de la célula madre cultivada, en base a la concentración medida.

35 El método se describirá seguidamente en detalle. El método incluye cultivar una célula madre en un medio. El cultivo de la célula madre en un medio es conocido en la técnica y, por tanto, los medios y las condiciones pueden ser apropiadamente seleccionados por un experto en la técnica dependiendo las células madre seleccionadas.

40 La célula madre se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una célula iPS, una célula madre embrionaria y célula madre adulta. La célula madre adulta se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una MSC, una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula madre endotelial y una célula madre hemotopoyética. La MSC puede ser derivada de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. La MSC puede incluir al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en una BM-MS, una UCB-MS, una MSC derivada de tejido adiposo, una SMC derivada de saco vitelino embrionario, una MSC derivada de placenta, una MSC derivada de la piel, una MSC derivada de sangre periférica, una MSC derivada de músculos, una MSC derivada del hígado, una MSC derivada de tejido nervioso, una MSC derivada de periostio, una MSC derivada de cordón umbilical, una MSC derivada de membrana fetal, una MSC derivada de tejido sinovial, una MSC de membrana amniótica, una MSC derivada del menisco, una MSC derivada de ligamento cruzado anterior, una MSC derivada de condrocitos articulares y una MSC separada y/o cultivada en otros tejidos que incluyen MSCs.

Por ejemplo, la célula madre puede ser una MSC y el medio puede ser un medio de mantenimiento de MSC o un medio de diferenciación condrogénica de una MSC. El medio se puede seleccionar entre el grupo que consiste en medio MEM- α , medio de mantenimiento de MSC (por ejemplo, un medio de MEM- α que contiene 10% de FBS y 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina) y un medio de diferenciación condrogénica de una MSC (por ejemplo, un medio que contiene

5 DMEM con elevado contenido de glucosa, 50 $\mu\text{g/ml}$ de ascorbato, dexametasona 0,1 μM , 40 $\mu\text{g/ml}$ de L-prolina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de piruvato, 10 ng/ml de TGF- β 3, 500 ng/ml de BMP-6, 50 mg/ml de ITS+ Y 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina). El procedimiento de cultivo se puede realizar usando un método que es comúnmente usado en un cultivo de MSC.

En el cultivo de la célula madre en un medio, solo la célula madre puede cultivada sin incluir otras células, u otras células además de la célula madre pueden ser cultivadas conjuntamente. Las otras células pueden ser células que producen TSP-2 o secretan extracelularmente la TSP-2. Es decir, las células en sí mismas secretas TSP-2, e interaccionan con la TSP-2, diferenciándose así en forma de un condrocito. Además, las células pueden ser células que entran en contacto con TSP-2 que es producida por otras células para ser secretadas o externamente administradas. Por ejemplo, las células que entran en contacto con TSP-2 pueden ser células que existen en tejidos con lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. La célula que existe

10 en un tejido con lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago puede ser el propio tejido o una célula que existe en un tejido expuesto debido a la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. El tejido expuesto puede variar dependiendo de un grado de la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. El tejido puede ser

15 seleccionado entre el grupo que consiste en líquido sinovial, periostio, hueso y médula ósea. El tejido puede ser un tejido con artritis o deformidad de las articulaciones. La artritis puede ser artritis reumatoide o artritis degenerativa. La célula que entra en contacto con TSP-2 puede ser una célula derivada de al menos uno de los tejidos con artritis degenerativa debida a envejecimiento, artritis degenerativa temprana debida a sobrecarga de las articulaciones que incluye obesidad; lesiones externas debidas a deportes, caídas, accidentes y similares, artritis degenerativa

20 secundariamente desarrollada por no tratar apropiadamente una lesión de cartílago debida a lesiones externas y deformidad de las articulaciones debida a lesión de ligamentos, debilidad muscular alrededor de las articulaciones, dislocación de las articulaciones, formación de ratones articulares y retraso del crecimiento óseo. Por ejemplo, la célula puede estar colocada en las proximidades de la célula que expresa TSP-2.

El método incluye medir la concentración de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2 e IL-17BR del cultivo. La concentración de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2 e IL-17BR puede ser medida a partir de un lisado celular o una materia sobrenadante del cultivo. La concentración de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2 e IL-17BR puede ser medida a un nivel de mRNA o un nivel de proteínas. La medición sobre un nivel de mRNA o proteínas es bien conocida en la técnica.

25 Por ejemplo, puede ser usada una reacción de cadena de polimerasa (PCR) cuantitativa o un ensayo inmunoabsorbente conectado a enzimas (ELISA).

La TSP-1 es una glicoproteína multimérica compuesta por monómeros iguales. El monómero tiene un peso molecular de aproximadamente 185 kDa en electroforesis de gel de poliacrilamida y dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras. Un multímero dominante es un trímero que tiene un peso molecular de aproximadamente 450 kDa sobre geles no reductores y los pesos moleculares por equilibrio de sedimentación son similares, a 135 kDa para monómeros y 420 kDa para trímeros. El peso molecular previsto de la secuencia de residuos de aminoácidos en el monómero es 127.524 Da, que no incluye las contribuciones de la glicosilación y β -hidroxilación. La TSP-1 se conoce que está implicada en la adhesión, proliferación y quimiotaxis celular. Se ha descrito también que la TSP-1 puede estar implicada en el progreso de tumores malignos. La TSP-1 puede tener una secuencia de aminoácidos descrita en RefSeq NP_003237 (humana) (SEQ ID NO: 3) o NP_035710 (ratón) (SEQ ID NO: 4) o una secuencia derivada de la misma.

30

35

40

45

La IL-17BR es una proteína que en seres humanos es codificada por el gen IL17RB. La IL-17BR es un receptor de citoquinas que se une específicamente a IL17B y a IL17E, pero no se une a IL17 y IL17C. La IL-17BR puede tener una secuencia de aminoácidos descrita en RefSeq NP_758434 (humana) (SEQ ID NO: 5) o NP_062529 (ratón) (SEQ ID NO: 6) o una secuencia derivada de la misma.

50

El factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidermal de unión a heparina (HB-EGF) ejerce sus actividades biológicas uniéndose a una clase erb de receptores de EGF (EGFR). El HB-EGF se une a heparina con una elevada afinidad. El HB-EGF se une a EGFR para modular los efectos biológicos del factor de crecimiento sobre células diana, incluido el desplazamiento y proliferación celular. El HB-EGF puede tener una secuencia de aminoácidos descrita en RefSeq NP_003237 (humana) (SEQ ID NO: 3) o NP_035710 (ratón) (SEQ ID NO: 4) o una secuencia derivada de la misma.

55

60

El método puede incluir identificar una capacidad de diferenciación condrogénica de la célula madre cultivada, en base a la concentración medida.

El procedimiento de identificación puede incluir comparar la concentración de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2 e IL-17BR con la concentración obtenida para una célula de referencia como testigo, que se identifica que tiene una capacidad de diferenciación condrogénica.

65

En el procedimiento de identificación, cuando la concentración medida es mayor que la concentración obtenida de la célula de referencia, se puede confirmar que la célula madre tiene una elevada capacidad de diferenciación en forma de un condrocito. Por otra parte, cuando la concentración medida es inferior o igual a la concentración obtenida de la célula de referencia, se puede determinar que la célula madre tiene una baja capacidad de diferenciación en un condrocito.

El procedimiento de identificación puede incluir, cuando una cantidad de expresión de TSP-2 es mayor que 72 pg/ml/1,0x10⁵ células cuando la célula madre es cultivada en monocapa en un medio de mantenimiento durante 1 día o cuando una cantidad de expresión de TSP-2 es mayor que 550 pg/ml/1.0x10⁵ células cuando la célula madre es un sedimento cultivado en un medio de mantenimiento durante 7 días, determinar que la célula madre tiene una elevada capacidad de diferenciación en forma de un condrocito. El medio de mantenimiento de la célula madre puede ser un medio que contiene MEM- α , 10% de FBS, y 50 μ g/ml de gentamicina y un medio de inducción condrogénico de la célula madre puede ser un medio que contiene un DMEM con elevado contenido de glucosa, 50 μ g/ml de ascorbato, dexametasona 0,1 μ M, 40 μ g/ml de L-prolina, 100 μ g/ml de piruvato, 10 ng/ml de TGF- β 3, 500 ng/ml de BMP-6, 50mg/ml de ITS+, y 50 μ g/ml de gentamicina.

El método puede incluir adicionalmente comparar la concentración medida de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2 e IL-17BR con la concentración de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2 e IL-17BR obtenidas de una célula de referencia como testigo, que se identifica que tiene una baja capacidad de diferenciación en forma de un condrocito.

Además, en el método de comparación, cuando la concentración medida de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2 e IL-17BR es de al menos 10%, al menos 20% o al menos 30% mayor que la concentración de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2 e IL-17BR obtenida a partir de la célula de referencia, se puede determinar que la célula madre tiene una capacidad de diferenciación en forma de un condrocito. La célula de referencia se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una BM-MSc, un fibroblasto y una UCB-MSc. La UCB-MSc se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una C5 UCB-MSc, una C6 UCB-MSc, y una C7 UCB-MSc.

La presente invención describe un método para diferenciar una célula en un condrocito, incluyendo el método diferenciar una célula que se determina que tiene una elevada capacidad de diferenciación en forma de un condrocito según el método anteriormente descrito, en forma de un condrocito.

El procedimiento de diferenciación se puede realizar in vitro o in vivo. El método puede incluir cultivar una célula que se determina que tiene una elevada capacidad de diferenciación en forma de un condrocito, por ejemplo, una MSC, en un medio de diferenciación condrogénica de una célula para diferenciar la célula, por ejemplo, la MSC, en forma de un condrocito in vitro. En el procedimiento de cultivo, la célula puede ser cultivada con un polímero biocompatible.

El polímero biocompatible se puede seleccionar entre polímeros comúnmente usados que pueden soportar células y/o mantener la actividad celular en una estructura bi- o tri-dimensional. Por ejemplo, el polímero biocompatible puede incluir al menos un polímero seleccionado entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, hidroxiapatita, quitosano, fibrina y colágeno.

El método puede incluir adicionalmente administrar la célula, por ejemplo, una MSC, a un sujeto que necesita una diferenciación condrogénica. El sujeto puede ser un sujeto con lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. Por ejemplo, el sujeto puede ser un sujeto con artritis o deformidad de articulaciones. La artritis puede ser artritis reumatoide o artritis degenerativa. El sujeto puede tener al menos uno de los tejidos con artritis degenerativa debida al envejecimiento; artritis degenerativa temprana debida a sobrecarga de las articulaciones que incluye obesidad; lesiones externas debidas a deportes, caídas, accidentes y similares; artritis degenerativa secundariamente desarrollada por no tratar apropiadamente una lesión de cartílago debida a lesiones externas; y deformidad de las articulaciones debida a una lesión de ligamentos, debilidad muscular alrededor de las articulaciones, dislocación de las articulaciones, formación de ratones articulares y retraso del crecimiento óseo. La lesión externa incluye una fractura. El procedimiento de administración se puede realizar mediante inyección intravenosa o inyección muscular o puede ser realizado localmente sobre los sitios de la lesión. La célula, por ejemplo, una MSC, puede ser administrada con un portador. El portador puede ser un medio, un tampón o un polímero biocompatible. El polímero biocompatible se puede seleccionar entre polímeros comúnmente usados que soportan células y/o mantienen la actividad celular en una estructura bi- o tri-dimensional. El polímero biocompatible puede incluir al menos un polímero seleccionado entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, hidroxiapatita, quitosano, fibrina y colágeno. La célula puede ser una célula madre. La célula madre puede incluir al menos una selecciona entre el grupo que consiste en una célula iPS, una célula madre embrionaria y una célula madre adulta. La célula madre adulta se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una MSC, una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula madre endotelial y célula madre hematopoyética. La MSC puede ser derivada de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. La MSC puede incluir al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en una BM-MSc, una UCB-MSc, una MSC derivada de tejido adiposo, una MSC derivada del saco vitelino embrionario, una MSC derivada de placenta, una MSC derivada de la piel, una MSC derivada de sangre periférica,

una MSC derivada de músculos, una MSC derivada del hígado, una MSC derivada de tejido nervioso, una MSC derivada de periostio, una MSC derivada de cordón umbilical, una MSC derivada de membrana fetal, una MSC derivada del tejido sinovial, una MSC derivada de membrana amniótica, una MSC derivada del menisco, una MSC derivada de ligamento cruzado anterior, una MSC derivada de condrocitos articulares y una MSC separada y/o cultivada de otros tejidos que incluyan MSCs.

La presente invención describe un método para identificar una muestra que incluye una célula capaz de diferenciarse en forma de un condrocito, incluyendo el método cultivar una muestra que contiene células en un medio y medir la concentración de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2, IL17BR y HB-EGF a partir del cultivo.

En el procedimiento de cultivo, la célula puede ser una célula madre. La célula madre puede ser una UCB-MSC. La célula capaz de diferenciarse en forma de un condrocito puede ser una célula madre, por ejemplo, la UCB-MSC. Además, la célula capaz de diferenciarse en forma de un condrocito puede ser una célula, por ejemplo, una UCB-MSC y otras células cultivadas con la célula madre. Las otras células pueden ser otros tipos de células madre. Las otras células pueden ser células que producen TSP-2 y secretan extracelularmente la TSP-2. Es decir, las células por sí mismas secretan TSP-2 e interaccionan con la TSP-2 para diferenciarse en forma de un condrocito. Además, las células pueden ser células que entran en contacto con TSP-2 que es producida por otras células o secretada o externamente administrada. Por ejemplo, las células que entran en contacto con TSP-2 pueden ser células que existen en tejidos con una lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o un defecto de cartílago. La célula que existe en un tejido con la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago pueden ser una célula que existe en el propio tejido y el tejido expuesto debido a la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. El tejido expuesto puede variar dependiendo del grado de la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. Por ejemplo, el tejido se puede seleccionar entre el grupo que consiste en líquido sinovial, periostio, hueso y médula ósea. El tejido puede ser un tejido con artritis o deformidad de las articulaciones. La artritis puede ser artritis reumatoide o artritis degenerativa. La célula que entra en contacto TSP-2 puede ser una célula derivada de al menos uno de los tejidos con artritis degenerativa debida a envejecimiento; artritis degenerativa temprana debida sobrecarga de las articulaciones que incluye obesidad; lesiones externas debidas a deportes, caídas, accidentes y similares; artritis degenerativa secundariamente desarrollada por no tratar apropiadamente una lesión de cartílago debida a lesiones externas y deformidad de las articulaciones debida a una lesión de ligamentos, debilidad muscular alrededor de las articulaciones, dislocación de las articulaciones, formación de ratones articulares y retraso del crecimiento óseo. Por ejemplo, la célula que entra en contacto con TSP-2 puede ser una célula colocada en las proximidades de la célula que expresa TSP-2. El medio puede ser un medio de mantenimiento celular o un medio de inducción condrogénica de una célula.

La presente invención describe una composición para disminuir la muerte de condrocitos, incluyendo la composición un factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF) y una célula madre que expresa un HB-EGF.

El HB-EGF puede ejercer sus actividades biológicas uniéndose a una clase erb de receptores de EGF (EGFR). El HB-EGF se une a heparina con afinidad elevada. El HB-EGF se une a EGFR para modular los efectos biológicos del factor de crecimiento sobre células diana que incluye el desplazamiento y proliferación celular. El HB-EGF puede tener una secuencia de aminoácidos descrita en RefSeq NP_001936 (humana) (SEQ ID NO: 7) o NP_034545 (ratón) (SEQ ID NO: 8) o una secuencia derivada de la misma.

La composición puede incluir una célula madre que expresa HB-EGF. La célula madre puede ser una UCB-MSC. La composición puede incluir un portador. Ya ha sido descrita una descripción detallada del portador.

La presente invención describe un método para disminuir la muerte de condrocitos en un sujeto, incluyendo el método administrar una composición para disminuir la muerte de condrocitos a un sujeto, incluyendo la composición un HB-EGF en una cantidad suficiente para disminuir la muerte de condrocitos y una célula madre que expresa un HB-EGF.

La cantidad suficiente para disminuir la muerte de condrocitos se refiere a una cantidad suficiente para disminuir la muerte de condrocitos más que un testigo. Por ejemplo, la cantidad suficiente para disminuir la muerte de condrocitos se refiere a una cantidad suficiente para disminuir la muerte de condrocitos al menos un 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% más que un testigo. Ya se ha proporcionado una descripción detallada de la composición. El sujeto puede ser un sujeto con una lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o un defecto de cartílago. La lesión, degeneración, pérdida o defecto de cartílago puede incluir artritis, osteoporosis, una fractura o una deformidad de las articulaciones. La artritis puede ser artritis reumatoide o artritis degenerativa. La lesión, degeneración, pérdida o defecto de cartílago puede derivar de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en artritis degenerativa debida a envejecimiento; artritis degenerativa temprana debida a sobrecarga de las articulaciones que incluye obesidad; lesiones externas debidas a deportes, caídas, accidentes y similares; artritis degenerativa secundariamente desarrollada por no tratar apropiadamente una lesión de cartílago debida a lesiones externas y deformidad de las articulaciones debida a una lesión de ligamentos, debilidad muscular alrededor de las articulaciones, dislocación de articulaciones, formación de ratones articulares y

5 retraso del crecimiento óseo. Además, el condrocito puede ser una célula derivada de al menos unos de los tejidos expuestos debido a la lesión, degeneración, pérdida o defecto del cartílago, por ejemplo, tejidos como líquido sinovial, periostio, hueso y médula ósea. El procedimiento de administración se puede realizar mediante inyección intravenosa, inyección muscular o se puede realizar localmente en los sitios de la lesión. El sujeto puede ser un mamífero. El mamífero puede incluir un ser humano, una vaca, un cerdo, un perro y un ratón.

10 La composición puede incluir adicionalmente un portador. El portador puede ser un medio, un tampón o un polímero biocompatible. El polímero biocompatible se puede seleccionar entre polímeros comúnmente usados que soportan células y/o mantienen la actividad celular en una estructura bi- o tri-dimensional. El polímero biocompatible puede incluir al menos un polímero seleccionado entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, hidroxiapatita, quitosano, fibrina y colágeno. El método se puede realizar in vitro o in vivo.

15 La presente invención describe un método para aumentar una expresión de al menos una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2, IL-17BR y HB-EGF a partir de una célula madre, incluyendo el método cultivar una célula madre en presencia de un fluido de articulaciones de un paciente con al menos una dolencia seleccionada entre el grupo que consiste en una lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago y sus combinaciones.

20 La célula madre puede ser una BM-MSC o una UCB-MSC. La expresión puede ser medida a un nivel de proteína o mRNA. La célula madre puede ser alógena o autóloga con respecto al líquido articular.

25 La al menos una dolencia seleccionada entre el grupo que consiste en la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago, defecto de cartílago y sus combinaciones puede incluir artritis y deformidad de las articulaciones. La artritis puede ser artritis reumatoide o artritis degenerativa. La dolencia puede incluir al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en artritis degenerativa debida a envejecimiento; artritis degenerativa temprana debida a sobrecarga de las articulaciones que incluye obesidad; lesiones externas debidas a deportes, caídas, accidentes y similares; artritis degenerativa secundariamente desarrollada por no tratar apropiadamente una lesión de cartílago debida a lesiones externas; y deformidad de las articulaciones debida a lesión de ligamentos, debilidad muscular alrededor de las articulaciones, dislocación de las articulaciones, formación de ratones articulares y retraso del crecimiento óseo. El método se puede realizar in vitro o in vivo. El líquido articular puede ser una célula que existe en el propio tejido con la dolencia anteriormente descrita y en tejidos expuestos debido a lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. La célula que existe en el tejido con la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago puede ser una célula que existe en el propio tejido y el tejido expuesto debido a la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. El tejido expuesto puede variar dependiendo del grado de la lesión de cartílago, degeneración de cartílago, pérdida de cartílago o defecto de cartílago. Por ejemplo, el tejido se puede seleccionar entre el grupo que consiste en líquido sinovial, periostio, hueso y médula ósea. Además, el líquido articular puede ser un fluido de articulaciones colocado en una posición arbitraria en un sujeto con la dolencia.

40 La presente invención describe un método de diferenciación de una célula madre en forma de una célula de tejido de lesión, incluyendo el método cultivar la célula madre en presencia de un tejido de la lesión.

45 El tejido de la lesión puede ser un fluido de articulaciones de pacientes con artritis, un líquido sinovial derivado de una cavidad de articulaciones de un paciente con artritis, un fluido de lavado broncoalveolar (BALF) de un paciente con un síndrome de dificultad respiratoria agua (ARDS), asma bronquial, cáncer de pulmón, una enfermedad pulmonar intersticial o enfermedad de obstrucción pulmonar crónica (COPD), o líquido cefalorraquídeo, fluido pleural, líquido ascítico o fluido gástrico recogidos de un paciente. El procedimiento de cultivo se puede realizar usando un método conocido en la técnica relacionada con el cultivo de células madre.

50 El método puede incluir adicionalmente administrar una célula madre diferenciada en una célula del tejido de la lesión, obtenida mediante el procedimiento de cultivo, por ejemplo, una MSC, a un sujeto con un tejido de lesión para tratar el tejido de la lesión. El tejido de la lesión y la célula madre, por ejemplo, una MSC, pueden ser alógenos o autólogos uno respecto a otro.

55 En el método, la célula madre puede incluir al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en una célula iPS, una célula madre embrionaria y una célula madre adulta. La célula madre adulta se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una MSC, una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula madre endotelial y una célula madre hematopoyética. La MSC puede ser derivada de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. La MSC puede incluir al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en una BM-MSC, una UCB-MSC, una MSC derivada de tejido adiposo, una MSC derivada de saco vitelino embrionario, una MSC derivada de placenta, una MSC derivada de la piel, una MSC derivada de sangre periférica, una MSC derivada de músculos, una MSC derivada del hígado, una MSC derivada de tejido nervioso, una MSC derivada de periostio, una MSC derivada de cordón umbilical, una MSC derivada de membrana fetal, una MSC derivada de líquido sinovial, una MSC derivada de membrana amniótica, una MSC del menisco, una MSC derivada del ligamento cruzado anterior, una MSC derivada de condrocitos articulares y una MSC separada y/o cultivada a partir de otros tejidos que incluyen MSCs. El método se puede realizar in vitro o in vivo.

La presente invención describe un método para seleccionar un material regulador de la actividad de células madre, incluyendo el método cultivar una célula madre en presencia de un tejido de lesión y medir un producto expresado a partir de la célula.

5 El método incluye cultivar una célula madre, por ejemplo, una MSC en presencia de un tejido de lesión. El tejido de lesión puede ser un fluido de articulaciones de un paciente con artritis; un líquido sinovial derivado de una cavidad de articulaciones de un paciente con artritis; un fluido de lavado broncoalveolar (BALF) de un paciente con síndrome de dificultad respiratoria agua (ARDS), asma bronquial, cáncer de pulmón y enfermedad pulmonar intersticial o una enfermedad de obstrucción pulmonar crónica (COPD); o un líquido cefalorraquídeo, un fluido pleural, un líquido ascítico o un fluido gástrico recogido de un paciente. El cultivo se puede realizar en presencia de un medio de mantenimiento de la célula madre, por ejemplo, una MSC o un medio de diferenciación de la célula madre, por ejemplo, una MSC, en un tejido correspondiente a un tejido de la lesión. El tejido de la lesión puede estar incluido en el cultivo en una cantidad que varía en el intervalo de 5 a 30%, por ejemplo, de 10 a 20% basado en un volumen de suspensión celular, una concentración celular o un número celular. El procedimiento de cultivo se puede realizar usando un método conocido en la técnica relacionado con el cultivo de células madre.

20 En el método, la célula madre puede incluir al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en una célula iPS, una célula madre embrionaria y una célula madre adulta. La célula madre adulta se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una MSC, una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula madre endotelial y una célula madre hematopoyética. La MSC puede ser derivada de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. La MSC puede incluir al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en una BM-MS, una UCB-MS, una MSC derivada de tejido adiposo, una MSC derivada de saco vitelino embrionario, una MSC derivado de placenta, una MSC derivada de la piel, una MSC derivada de sangre periférica, una MSC derivada de músculo, una MSC derivada del hígado, una MSC derivada de tejido nervioso, una MSC derivada del periostio, una MSC derivada de cordón umbilical, una MSC derivada de membrana fetal, una MSC derivada de tejido sinovial, una MSC derivada de membrana amniótica, una MSC derivada del menisco, una MSC derivada de ligamento cruzado anterior, una MSC derivada de condrocitos y una MSC separada y/o cultivada de otros tejidos que incluyen MSCs. El método se puede realizar in vitro o in vivo.

30 El método incluye medir un producto expresado a partir del cultivo. La medición se puede realizar usando un método conocido. Por ejemplo, la medición se puede realizar mediante PCR cuantitativa cuando el producto es RNA. Por otra parte, la medición se puede realizar mediante ELISA cuando el producto es una proteína. El producto puede ser RNA o una proteína.

35 El método puede incluir identificar un material que regula la actividad de la célula madre, por ejemplo, la actividad de una MSC, a partir del producto medido. La actividad de la célula madre, por ejemplo, la MSC, puede ser una actividad de diferenciación. El método puede incluir adicionalmente comparar la cantidad del producto medido con la cantidad de un producto obtenido a través de un experimento testigo. El experimento testigo puede ser un experimento testigo negativo o positivo. El experimento testigo se puede realizar cultivando una célula madre, por ejemplo, una MSC, pero no usando tejido de lesión o en presencia de tejido normal en lugar de un tejido de lesión y midiendo un producto expresado a partir del cultivo.

45 El método puede incluir, cuando la cantidad de producto es mayor que la del testigo, determinar que el tejido de la lesión regula positivamente la actividad de la célula madre, por ejemplo, la actividad de la MSC. El método puede incluir, cuando la cantidad del producto es más pequeña que la del testigo, determinar que el tejido de la lesión regula negativamente la actividad de la célula madre, por ejemplo, la actividad de la MSC. La diferenciación puede ser una diferenciación en forma de un tejido correspondiente a un tejido de la lesión. Por ejemplo, cuando el tejido de la lesión es un fluido de articulaciones, se puede diferenciar en forma de un condrocito.

50 La presente invención describe un método para aumentar una expresión de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-2 y EB-EGF a partir de una célula madre, incluyendo el método el cultivo en sedimento de una célula madre.

55 El cultivo en sedimento de una célula madre se puede realizar en un estado en el que la célula madre se agrega de forma tridimensional. Por ejemplo, el cultivo en sedimento se puede realizar centrifugando una suspensión que contiene células para formar un sedimento de células precipitadas y cultivar el sedimento. A este respecto, una concentración de células inicial usada en el cultivo puede ser de 5×10^5 células/ml a 5×10^7 células/ml. El procedimiento de centrifugación se puede realizar de 350 g a 1.500 g durante 5 a 30 minutos. La célula madre se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una célula iPS, una célula madre embrionaria y una célula madre adulta. La célula madre adulta se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una MSC, una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula madre endotelial y una célula madre hematopoyética. La MSC puede ser derivada de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. La MSC puede incluir al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en una BM-MS, una UCB-MS, una MSC derivada de tejido adiposo, una MSC derivada de saco vitelino embrionario, una MSC derivada de placenta, una MSC derivada de la piel, una MSC derivada de sangre periférica, una MSC derivada de músculo, una MSC derivada del hígado, una MSC derivada de tejido

nervioso, una MSC derivada del periostio, una MSC derivada de cordón umbilical, una MSC derivada de membrana fetal, una MSC derivada de líquido sinovial, una MSC derivada de membrana amniótica, una MSC derivada del menisco, una MSC derivada del ligamento cruzado anterior, una MSC derivada de condrocitos articulares y una MSC separada y/o cultivada a partir de otros tejidos que incluyan MSCs.

5 Efectos ventajosos

Una composición que incluye TSP-2 puede estimular la diferenciación de una célula, por ejemplo, una MSC, en forma de un condrocito.

10 Según la presente invención, se proporciona un método para identificar una capacidad de una célula, por ejemplo, una MSC, para diferenciarse en forma de un condrocito, usando TSP-1, TSP-2 o IL-17BR, con lo que puede ser eficazmente identificada la capacidad de diferenciación condrogénica de la MSC.

15 La presente invención describe un método de diferenciación de una célula, por ejemplo, una MSC, en forma de un condrocito, usando TSP-1, TSP-2 o IL-17BR, con lo que la célula, por ejemplo, la MSC, puede ser eficazmente diferenciada en forma de un condrocito.

20 La presente invención describe un método de diferenciación de célula, por ejemplo, una MSC, en forma de una célula de tejido de lesión, con lo que la célula, por ejemplo, la MSC, puede ser eficazmente diferenciada en una célula de tejido de lesión.

25 La presente invención describe un método para seleccionar un material regulador de la actividad celular, por ejemplo, la actividad de una MSC, con lo que un material regulador de la actividad celular, por ejemplo, la actividad de la MSC, puede ser eficazmente seleccionado.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 ilustra imágenes que muestran los resultados de diferenciar respectivamente 7 tipos de célula madre mesenquimal sanguínea de cordón umbilical (UCB-MSC), es decir, C1, C2, C3, C4, C5, C6 y C7, cultivadas en medios diferentes durante 4 semanas;

35 la figura 2 es un gráfico que muestra una cantidad de expresión de mRNA de trombospondina 2 (TSP-2) de UCB-MSC cultivada en un medio de diferenciación condrogénico;

las figuras 3 y 4 son gráficos que muestran las cantidades de TSP-2 en una materia sobrenadante de cultivo, obtenido mediante ensayo inmunoabsorbente concentrado a enzima (ELISA);

40 la figura 5 ilustra una imagen que muestra un tamaño de sedimento de una UCB-MSC cultivada en presencia o ausencia TSP-2;

la figura 6 es un gráfico que muestra TSP-2 expresada en materia sobrenadante de cultivo de cada uno de 6 tipos de UCB-MSC cultivados en un medio de diferenciación condrogénico;

45 la figura 7 ilustra imágenes que muestran la diferenciación condrogénica de una UCB-MSC y célula madre mesenquimal de médula ósea (BM-MSC) in vitro;

50 la figura 8 es un gráfico que muestra las capacidades de una UCB-MSC y una BM-MSC para diferenciarse en forma linaje condrogénica;

la figura 9 ilustra imágenes que muestran la diferenciación condrogénica de 10 tipos de BM-MSC y 10 tipos de UCB-MSC analizadas a la sexta semana después de una inducción de diferenciación condrogénica, según la presente invención;

55 la figura 10 ilustra imágenes que muestran una diferencia en la capacidad de condrogénesis entre una UCM-MSC y una BM-MSC en la sexta semana después de una inducción de diferenciación condrogénica;

60 la figura 11 es un gráfico que muestra los resultados de expresión de TSP-2 bajo condiciones de cultivo de monocapa y sedimento en presencia de una combinación de factores de crecimiento;

la figura 12 es un gráfico que muestra un nivel de expresión de TSP-2 según los tipos de UCB-MSC;

65 la figura 13 es un gráfico que muestra resultados de mediciones de cantidades de expresión de TSP-2 obtenidos mediante cultivo de sedimento de una C3 UCM-MSC y una C5 UCM-MSC durante 3 días;

la figura 14 ilustra gráficos que muestran la cantidad de TSP-2 expresada por una UCB-MSC bajo condiciones de

diferenciación y desdiferenciación;

las figuras 15 a 17 son gráficos que muestran la cantidad de expresión de una proteína marcadora de una UCB-
MSC cultivada en presencia de TSP-2;

5 la figura 18 ilustra gráficos que muestran el grado de diferenciación condrogénica de una UCB-MSC cultivada en un medio condrogénico bajo condiciones de expresión-inhibición de TSP-2;

10 la figura 19 es un gráfico que muestra el nivel de TSP-2 en plasma sanguíneo en una persona normal y un paciente con osteoartritis;

las figuras 20 y 21 son gráficos que muestran cantidades de expresión de TSP-1 de una UCB-MSC en presencia de un líquido articular de un paciente con artritis;

15 la figura 22 es un gráfico que muestra resultados de analizar la cantidad de mRNA de receptor de interleucina 17B (IL-17BR) obtenida lisando una UCB-MSC diferenciada en forma de cartílago mediante una reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR);

20 la figura 23 ilustra gráficos que muestran resultados de mediciones de mRNA de factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidermal de unión a heparina (HB-EGF) en una UCB-MSC cultivada en presencia un líquido articular de un paciente con artritis;

la figura 24 es un diagrama que muestra una cantidad de expresión de HB-EGF en una UCB-MSC cultivada bajo condiciones de muerte de condrocitos;

25 la figura 25 ilustra imágenes que muestran resultados de observación de un condrocito derivado de conejo cultivado en presencia HB-EGF; y

30 la figura 26 es un gráfico que muestra resultados de cultivo de sedimento de UCB-MSC y BM-MSC.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se describirá seguidamente haciendo referencia a los ejemplos siguientes. Estos ejemplos son para fines ilustrativos y no está previsto que limiten el alcance de la presente invención.

35 EJEMPLO 1: Identificación de proteínas secretoras específicamente inducidas en una UCB-MSC mediante líquido articular de un paciente con artritis (no entra en el alcance de la presente invención)

40 Para identificar un material que regula la regeneración de cartílagos y la inflamación de cartílagos producidas por una UCB-MSC, un líquido articular de un paciente con artritis fue añadido a un medio con una UCB-MSC que estaba siendo cultivada en el mismo hasta alcanzar una concentración final de 20% (v/v) y seguidamente un producto resultante se cultivó adicionalmente durante 3 horas. La materia sobrenadante del cultivo obtenido se usó como una muestra de análisis. Además, como un testigo, se usaron un cultivo de UCB-MSC cultivado en un estado en el que el líquido articular no fue añadido al mismo y/o un medio que incluía 20% (v/v) de líquido articular en el que no se cultivó una UCB-MSC. El líquido articular se obtuvo de un paciente con artritis degenerativa.

50 Los pacientes que se esperaba que estuvieran incluidos en cada cultivo obtenido o muestra testigo fueron marcados con un marcador detectable. El marcador era biotina y la biotina fue detectada mediante detección fluorescente de un complejo formado por una unión específica entre la biotina y la estreptavidina marcada por fluorescencia. Seguidamente, un chip de proteínas con anticuerpos que se unen respectivamente a 507 proteínas secretoras inmovilizadas en el mismo fue tratado con cada muestra (RayBiotech, Inc., RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array I; Cat# AAH-BLG-1-2) para reaccionar conjuntamente según las normas del fabricante. Después de la reacción se irradió un luz de excitación de 532 nm al chip de proteínas usando un escáner de láser (Axon Genepix Scanner 4000B) y se detectó una luz de radiación a 635 nm. Comparando la señal de detección obtenida con una
55 señal de detección de referencia obtenida a partir de un testigo, se determinó la concentración de cada proteína en la muestra.

60 Como resultado del análisis, cuando la UCB-MSC se cultivó en presencia de un líquido articular de un paciente con artritis, la TSP-1, TSP-2, IL-17BR y HB-EGF aumentaron significativamente, en comparación con el caso en que la UCB-MSC se cultivara en ausencia de un líquido articular de un paciente con artritis.

EJEMPLO 2: Asociación de diferenciación condrogénica de UCB-MSC con TSP-2

65 En el presente ejemplo, se evaluó la asociación de la diferenciación condrogénica de una UCB-MSC con TSP-2. Además, se evaluó si la TSP-2 inducía a una UCB-MSC a diferenciarse en forma de un condrocito.

(1) Capacidad de diferenciación condrogénica de tipos de UCB-MSC

En primer lugar, se confirmaron las capacidades de diferenciación condrogénica de diversos tipos de UCB-MSC. Cada tipo de UCB-MSC fue cultivado en sedimento en un medio de diferenciación condrogénica. El medio de diferenciación condrogénica era DMEM con elevado contenido de glucosa que contenía 50 µg/ml de ascorbato, dexametasona 0,1 µM, 40 µg/ml de L-prolina, 100 µg/ml de piruvato, 10 ng/ml de TGF-β3, 500 ng/ml de BMP-6, 50mg de ITS+/ml, y 50 µg/ml de gentamicina. La concentración celular inicial fue de 5x10⁵ células/ml y el cultivo se realizó en un tubo de polipropileno de 15 ml durante 4 semanas. El medio se cambió dos veces a la semana y se inmovilizó un sedimento con paraformaldehído al 4% contenido en parafina y se cortó en trozo con un grosor de 5 µm. El trozo se tiñó con Safranin-O para detectar un proteoglicano aniónico.

La figura 1 muestra imágenes de resultados de diferenciar respectivamente 7 tipos de UCB-MSC, es decir, C1, C2, C3, C4, C5, C6 y C7 en un medio de diferenciación durante 4 semanas, según una realización de la presente invención. Haciendo referencia a la figura 1, se confirmó que C1 y C2, que se clasificó que tenían buenas capacidades de diferenciación condrogénica, teniendo cada una secciones transversales que tenían espacios vacíos redondos con contornos distintos satisfactoriamente formados completamente sobre las mismas. A este respecto, los espacios vacíos son marcadores que permiten la confirmación de la presencia de cartílago. Además, C3 y C4, que se clasificó que tenían capacidades de diferenciación condrogénica medias, tienen cada uno secciones transversales que tienen espacios vacíos pequeños con contornos distintos completa o parcialmente formados sobre las mismas. En los casos de C5, C6 y C7, que se clasificó que tenían escasas capacidades de diferenciación condrogénica, las estructuras de espacios vacíos a penas están formadas. Esto indica que la UCB-MSC tiene diferentes capacidades de diferenciación debido a diferencias genéticas entre individuos y diferencias en los procedimientos para la recogida de sangre de cordón umbilical.

(2) Asociación de capacidad de diferenciación condrogénica con TSP-2

Tipos de UCB-MSC que tenían diferentes capacidades de diferenciación condrogénica fueron cultivados cada uno en un medio de diferenciación condrogénica durante 1 semana y se midió la cantidad de mRNA de TSP-2 de la célula cultivada mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) usando un RNA total como plantilla y un cebador específico de TSP-2.

La figura 2 es un gráfico que muestra una cantidad de expresión de mRNA de TSP-2 de una UCB-MSC cultivada en un medio de diferenciación condrogénico, según una realización de la presente invención. Haciendo referencia a la figura 2, se expresó TSP-2 en la mayor cantidad en una UCB-MSC C1 (o C2) que tenía una elevada capacidad de diferenciación condrogénica, mientras que la expresión de TSP-2 fue débil en C5 (C6 o C7) UCB-MSC que tenía una baja capacidad de diferenciación condrogénica.

Además, los tipos de UCB-MSC que tienen capacidades de diferenciación condrogénica se cultivaron cada uno en un medio de diferenciación condrogénica y se analizó la concentración de TSP-2 en la materia sobrenadante del cultivo obtenido mediante ELISA según el tiempo.

Las figuras 3 y 4 son gráficos que muestran la cantidad de TSP-2 en la materia sobrenadante de un cultivo mediante ELISA, según realizaciones de la presente invención. Haciendo referencia a las figuras 3 y 4, se expresó un elevado de TSP-2 en una C1 o C2 UCB-MSC que tenía una elevada capacidad de diferenciación condrogénica (referencia a la figura 3), mientras que se expresó un nivel muy bajo de TSP-2 en una C5, C6 o C7 UCB-MSC (referencia a la figura 4).

(3) Actividad de TSP-2 para inducir diferenciación condrogénica

Una UCB-MSC se cultivó en sedimento en un medio de diferenciación condrogénica que contenía 10 ng/ml de proteína TSP-2 humana aislada y purificada (R&D System, Minneapolis, MN, USA) y se midió su tamaño de sedimento. A medida que la UCB-MSC se diferencia en forma de un condrocito, aumenta la síntesis de matriz extracelular (ECM) y, por tanto, el tamaño del sedimento representa un grado de la diferenciación condrogénica.

La figura 5 es una imagen que muestra un tamaño de sedimento de una UCB-MSC cultivada en presencia o ausencia de TSP-2, según una realización de la presente invención. En la figura 5, el tamaño del sedimento del testigo fue 258526,070 µm², y, cuando se usó el medio de diferenciación condrogénica que contenía 10 ng/ml de TSP-2, el tamaño del sedimento fue 3,49 mayor que el del testigo, es decir, 901919,431 µm². Como se ilustra en figura 5 el tamaño del sedimento de la UCB-MSC aumentó por medio de TSP-2, lo que indica que la TSP-2 induce la diferenciación condrogénica.

EJEMPLO 3: Nivel de expresión de TSP-2 según la capacidad de diferenciación condrogénica

En el presente ejemplo, se midió un nivel de expresión de TSP-2 de una UCB-MSC según su capacidad de diferenciación condrogénica. En primer lugar, se cultivaron C3, C4 y C5 UCB-MSCs cada una en medio de diferenciación condrogénica bajo las mismas condiciones durante 7 días para inducir la diferenciación condrogénica.

Las capacidades de diferenciación condrogénica relativas de las C3, C4 y C5 UCB-MSCs se confirmaron previamente mediante un experimento, y cumplieron la condición de $C3 > C4 > C5$. Seguidamente, se midió la TSP-2 en la materia sobrenadante del cultivo obtenido mediante ELISA.

5 La figura 6 es un gráfico que muestra TSP-2 expresada en una materia sobrenadante de cultivo de cada uno de tres tipos de UCB-MSC cultivados en un medio de diferenciación condrogénico, según una realización de la presente invención. Haciendo referencia a la figura 6 la C5 UCB-MSC, que fue clasificada por tener la más baja capacidad de diferenciación condrogénica, secreto 72 pg/ml de TSP-2 por 1×10^5 células en un estado antes de la inducción de la diferenciación condrogénica (estado naive o desprovisto de sistema inmune), secretó 1,2 ng/ml de TSP-2 por 1×10^5 células en el tercer día después de la inducción de la diferenciación condrogénica y secreto 0,550 ng/ml de TSP-2 por 1×10^5 células en el séptimo día después de la inducción de la diferenciación condrogénica. Por tanto, la UCB-MSC que expresa TSP-2 hasta una cantidad mayor que la de TSP-2 expresada por la C5 UCB-MSC puede ser seleccionada como una UCB-MSC adecuada para ser usada en diferenciación condrogénica.

15 EJEMPLO 4: Capacidades de condrogénesis de UCB-MSC y BM-MSC

Se realizó un experimento de condrogénesis in vitro usando una UCB-MSC y una BM-MSC derivadas cada una de aproximadamente 10 donantes humanos diferentes.

20 (1) Preparación de UCB-MSC y BM-MSC

Se obtuvo una muestra de sangre de cordón umbilical (UCB) a partir de la vena umbilical de suministros bajo consentimiento maternal informado. Se obtuvo un aspirado de médula ósea de una cresta ilíaca de cada donante bajo consentimiento de cada donante. Se aislaron células mononucleares de tipo célula madre mesenquimal (MSC) adherente y en forma de agujas de BM y UCM humanas a través del mismo procedimiento. Se confirmaron las siguientes propiedades de las células mononucleares de tipo MSC adherentes y en forma de agujas obtenidas a partir de los dos orígenes: (1) diferenciación (proliferatividad), (2) adhesión, (3) forma de agujas, (4) antígenos de superficie celular usando citometría de flujo y capacidad de diferenciación en forma de tejido mesenquimal como el hueso y el cartílago.

30 Un fenotipo de antígeno de superficie celular de las células mononucleares de tipo MSC adherentes y en forma de agujas obtenido a partir de los dos orígenes, que se confirmó que cumplía los requisitos de (1) a (3), fue negativo para CD14, CD34 y CD45 (marcador hematopoyético) y HLA-DR (marcador de clase II), mientras que positivo para CD29, CD44, CD73, CD105 y CD90 (marcador de MSC) y HLA-ABC (marcador de clase I). Como un fibroblasto expresa también el mismo conjunto de antígenos superficiales que los anteriormente descritos y es una célula proliferativa en forma de agujas adherente, las propiedades de las células mononucleares de tipo MSC se confirmaron adicionalmente para confirmar la capacidad potencial de diferenciación apropiada de una MSC en forma de tejido mesenquimal como el hueso y el cartílago.

40 (2) Confirmación de la capacidad de diferenciación condrogénica y propiedad de cada tipo de MSC

Una BM-MSC o una UCB-MSC se cultivo en sedimento en un medio de diferenciación condrogénico durante 6 semanas para inducir la condrogenesis. Como medio de diferenciación condrogénico, se usó un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con elevado contenido de glucosa complementado con 500 ng/ml proteína-6 morfogenética ósea (BMP-6) (R&D System, Minneapolis, MN, USA), 10 ng/ml de factor- β 3 de crecimiento transformante (TGF β 3) (Sigma), ITS+ mezcla previa (6,25 μ g/ml de insulina, 6,25 μ g/ml de transferrina, 6,25 ng/ml de ácido selenioso, 1,25 mg/ml de BSA y 5,35 mg/ml de ácido linoleico, dilución 1:100, Becton Dickinson), dexametasona 100 nM (Sigma), 50 μ g/ml de ascorbato-2-fosfato, 40 μ g/ml de L-prolina (Sigma), y 100 μ g/ml de piruvato (Sigma). El medio de diferenciación condrogénica es comúnmente usado por un experto en la técnica de la condrogénesis (véase "Pellet Culture" in Materials and Methods of PNAS, Vol.99, No. 7, pags.4397-4402 (2002); "Chondrogenesis" in MATERIALS AND METHODS of Stem cells, 20(2002): 530-41). Es conocido que la UCB-MSC y la BM-MSC se diferencian fácilmente en forma de un condrocito.

55 Una MSC de 4 a 6 pasos se separó con tripsina y seguidamente se puso en suspensión en 5×10^5 /ml en el medio de diferenciación condrogénica. Seguidamente, la suspensión se añadió a un tubo de polipropileno de 15 ml y la MSC se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para formar un sedimento. El sedimento obtenido se cultivó. El medio se cambió dos veces por semana y el sedimento se inmovilizó con paraformaldehído al 4% contenido en una parafina según el tiempo y se cortó en un trozo de 5 μ m de grosor. El trozo se tiñó con Safranin-O para detectar un proteoglicano aniónico. Además, el trozo se sometió a inmunotinción de colágeno de tipo II. La diferenciación condrogénica se determinó según si los sedimentos que tenían alrededor de la forma se formaron en un cultivo en sedimento, si existía proteoglicano específico de cartilago en una contra-tinción mediante Safranin-O o hematoxilina y si existía colágeno de tipo II en la inmunotinción de colágeno de tipo II.

65 La figura 7 ilustra imágenes que muestran la diferenciación condrogénica in vitro de UCB-MSC y BM-MSC, según una realización de la presente invención. En la figura 7 los sedimentos a, c y e representan respectivamente resultados de tintados de tinción con Safranin-O de la UCB-MSC obtenida 1 semana (a), 3 semanas (c) y 6 semanas

(e) después de la condrogénesis in vitro y los sedimentos b, d y f representan respectivamente resultados de tinción con Safranin-O de la BM-MSC obtenida 1 semana (b), 3 semanas (d) y semanas (f) después de la condrogénesis in vitro. Además, g y h representan respectivamente resultados de inmunotinción con colágeno de tipo II de la UCB-MSC y la BM-MSC obtenidos 6 semanas después de la condrogénesis in vitro.

La tinción naranja-roja específica de Safranin-O fue más distintiva en la UCB-MSC obtenida 6 semanas de la condrogénesis in vitro que la BM-MSC obtenida 6 semanas después de la condrogénesis in vitro (referencia a e y f). Además, la inmunotinción con colágeno II (indicada mediante flechas en la figura 7) fue más distintiva en la UCB-MSC obtenida 6 semanas después de la condrogénesis in vitro que en la BM-MSC obtenida 6 semanas después de la condrogénesis in vitro (referencia a g y h).

Una semana después de la inducción de la condrogénesis, la UCB-MSC y la BM-MSC no mostraron diferencias distintivas en la tinción con naranja-roja específica de Safranin-O. 3 semanas después de la inducción de la condrogénesis, la BM-MSC no mostró forma de cartílago alguna, mientras que la UCB-MSC comenzó a exhibir una forma de condrocito. Es decir, en el caso de la UCB-MSC, se observaron células de tipo pericondrio fuera del sedimento, una matriz extra-celular comenzó a ser secretada dentro del sedimento y la UCB-MSC comenzó a ser débilmente positiva a la tinción con Safranin-O. 6 semanas después de la inducción de la condrogénesis, la BM-MSC mostró el mismo grado de condrogénesis que la UCB-MSC de 3 semanas, mientras la UCB-MSC mostró una forma de tejido de condrogénesis típica. Para confirmar si se formó un condrocito normal en funcionamiento, se realizó una inmunotinción con colágeno II y, como consecuencia, se observó una tinción positiva de color marrón, como se indica mediante flechas en la figura 7. Comparando la UCB-MSC con la BM-MSC, la UCB-MSC exhibe un resultado más positivo que la BM-MSC, lo que indica que la UCB-MSC tiene una mejor capacidad de condrogénesis.

Como conclusión, como se ilustra en la figura 7, la capacidad de condrogénesis de la UCB-MSC es significativamente mejor que la de BM-MSC.

La figura 8 es un gráfico que muestra las capacidades de una UCB-MSC y una BM-MSC para diferenciarse en forma de un linaje condrogénico, según una realización de la presente invención. Se realizó un experimento para determinar las capacidades de UCB-MSC y BM-MSC para diferenciarse en forma de linaje de condrocitos como sigue- En primer lugar, una MSC de 4 a 6 pasos se separó con tripsina, y seguidamente se puso en suspensión en 5×10^5 células/ml en un medio de diferenciación condrogénica. Seguidamente, la suspensión se añadió a un tubo de polipropileno de 15 ml y la MSC se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para formar un sedimento. El sedimento obtenido se cultivó. El medio se cambió dos veces por semana.

Haciendo referencia a la figura 8, 7 de 10 muestras de UCB-MSC (70%) tenían una capacidad para diferenciarse en forma del linaje condrogénico, mientras que 5 de 10 muestras de BM-MSC (50%) tenían una capacidad para diferenciarse en forma del linaje condrogénico. 6 semanas después de la diferenciación condrogénica, el tamaño de un área de sedimento de la UCB-MSC ($n=7$, $1450123,7 \pm 24256,9 \mu\text{m}^2$) ($p<0,02$) era mucho mayor que el tamaño de un área de sedimento de la BM-MSC ($n=5$, $346531,3 \pm 87396,6 \mu\text{m}^2$). Las áreas de sedimentos y áreas de positivas para Safranin-O se midieron por medio de un software i-solution (IM Technology, Doosan, Daejeon).

La figura 9 ilustra imágenes que muestran la diferenciación condrogénica de 10 tipos de BM-MSC y 10 tipos de UCB-MSC analizadas en la sexta semana después de la inducción de la diferenciación condrogénica, según una realización de la presente invención. Haciendo referencia a la figura 9, la tinción naranja-roja específica de proteoglicano de cartílago mediante Safranin-O fue distintiva en 7 tipos de UCB-MSC (un conjunto 5 de un conjunto superior y 2 de un conjunto inferior), mientras que fue distintivo en 5 tipos de BM-MSC (conjunto B-5 del conjunto superior). Es decir, un 70% de los tipos totales de UCB-MSC se diferenciaron en forma del linaje condrogénico, mientras que solamente un 50% de los tipos totales de BM-MSC se diferenciaron en forma del linaje condrogénico.

La figura 10 ilustra imágenes que muestran una diferencia en la capacidad de condrogénesis entre una UCB-MSC y una BM-MSC en la sexta semana después de la inducción de la diferenciación condrogénica, según una realización de la presente invención. La figura 10 muestra claramente una diferencia entre sedimentos de cartílago producidos a partir de UCB-MSC y sedimentos de cartílago producidos a partir de BM-MSC, en que el mismo número de UCB-MSC y BM-MSC fueron cultivados durante 6 semanas bajo las mismas condiciones condrogénicas. Haciendo referencia a la figura 10 el sedimento de cartílago producido a partir de la UCB-MSC es obviamente mucho mayor que el sedimento de cartílago producido a partir de la BM-MSC. Además, una matriz de proteoglicano específica de cartílago fue más abundante y distintiva en el sedimento de cartílago derivado de UCB-MSC con células de tipo condrocitos que rodeaban el espacio vacío que en el sedimento de cartílago derivado de BM-MSC. Esto indica que la UCB-MSC tenía una capacidad de condrogénesis superior a la de la BM-MSC bajo las mismas condiciones condrogénicas in vivo.

Estos resultados verifican que la capacidad de diferenciación condrogénica de la UCB-MSC es estadísticamente más significativa que la de la BM-MSC. Debido a este hecho, las MSCs pueden tener características celulares diferenciales estadísticamente diferentes, aunque las MSCs se denominan igual. Es decir, esto indica que las MSCs iguales pueden ser clasificadas también como diferentes tipos de células. En la presente realización, se realizó un ensayo de diferenciación para ensayar una diferencia en tipos de células MSC, en que la diferenciación depende (1)

de la identidad de las MSCs diferentes a fibroblastos terminalmente diferenciados y (2) en particular, del origen y edad de un tejido fuente a partir del cual se aisló cada tipo de MSC.

Se usó el mismo medio condrogénico para la UCB-MSc y la BM-MSc. Además, una combinación de factores de crecimiento contenida en el medio es introducida para la condrogénesis de la BM-MSc y es bien conocido en la técnica (Biochemical and Biophysical Research Communications 320 (2004): Abstract on págs. 914-919, "Cell culture" and "Pellet culture" of Materials and Methods). Por tanto, las condiciones específicas del medio usado en la presente realización no afectan preferentemente a la capacidad condrogénica de la UCB-MSc. Además, la UCB-MSc tiene una actividad condrogénica in vitro superior a la de BM-MSc.

EJEMPLO 5: Identificación de la expresión de TSP-2 en UCM-MSc

En el presente ejemplo, se identificó un inductor de expresión de TSP-2 en una UCB-MSc variando las condiciones de cultivo.

En primer lugar, una UCB-MSc que fue cultivada en monocapa fue tratada con tripsina para ser separada y se puso en suspensión hasta una concentración 5×10^5 células/ml en DMEM exento de suero y el producto resultante se cultivó durante 24 horas. El medio usado fue un DMEM que contenía dexametasona 100 nM, 50 $\mu\text{g/ml}$ de ascorbato-2-fosfato, 40 $\mu\text{g/ml}$ de L-prolina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de piruvato) y un DMEM complementado con un factor de crecimiento seleccionado entre 10 ng/ml de TGF- β 3 (Sigma), 500 ng/ml de BMP-6 (R&D System, Minneapolis, MN, USA) e ITS+ (6,25 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 6,25 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina, 6,25 $\mu\text{g/ml}$ de ácido selenioso, 1,25 mg/ml de BSA y 5,35 mg/ml de ácido linoleico, dilución 1:100, Becton Dickinson). La UCB-MSc fue cultivada en monocapa o cultivada en sedimento. En el caso del cultivo en sedimento, la suspensión se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para formar un sedimento celular, y el sedimento celular obtenido se cultivó.

Después de que se recogió la materia sobrenadante del cultivo obtenido, se obtuvo un lisado celular y se midió un nivel de mRNA de TSP-2 de la UCB-MSc usando una reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) usando un RNA total extraído del lisado celular como plantilla.

La figura 11 es un gráfico que muestra resultados de expresión de TSP-2 bajo condiciones de cultivo monocapa y en sedimento en presencia de una combinación de factores de crecimiento, según una realización de la presente invención. Haciendo referencia a la figura 11, la expresión de TSP-2 aumentó significativamente bajo las condiciones de cultivo en sedimento. Además, a partir de los resultados ilustrados en la figura 11, se confirmó que el factor de crecimiento no afectó a la expresión de TSP-2.

EJEMPLO 6: Selección de tipos de células adecuados para ser usados en condrogénesis

Se cultivó una UCB-MSc en un medio que no inducía condrogénesis, y se confirmó si una cantidad de expresión de TSP-2 estaba asociada con una capacidad de diferenciación condrogénica de la UCB-MSc.

En particular, las UCB- C3 y C5 MSCs fueron cultivadas en monocapas y cultivadas en sedimentos en un DMEM exento de suero (que contenía dexametasona 100 nM, 50 $\mu\text{g/ml}$ de ascorbato-2-fosfato, 40 $\mu\text{g/ml}$ de L-prolina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de piruvato) hasta una concentración de 5×10^5 células/ml. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las del Ejemplo 5. La cantidad de expresión de TSP-2 en la materia sobrenadante del cultivo obtenido se midió mediante ELISA. Además, las condiciones de cultivo de una BM-MSc fueron también las mismas que las de la UCB-MSc.

La figura 12 es un gráfico que muestra un grado de expresión de TSP-2 según los tipos de UCB-MSc, según una realización de la presente invención. En la figura 12, C3 y C5 representan tipos de células UCB-MSc, y naive y en sedimentos representan respectivamente cultivar en monocapas durante 24 horas de cultivo en monocapa durante 24 horas. Los resultados de una observación con microscopio óptico de C3 y C5 durante el procedimiento de cultivo y después del procedimiento de cultivo son los mismos que los de C3 y C5 de la figura 1.

Haciendo referencia a la figura 12, el C5 cultivado en monocapa (naive) representaba 33 a 72 pg/ml de TSP-2 por $1,0 \times 10^5$ células, mientras que el C5 cultivado en sedimento (sedimento) expresó 163 a 550 pg/ml de TSP-2 por $1,0 \times 10^5$ células. Se confirmó previamente que la capacidad de condrogénesis de la C3 UCB-MSc fue mejor que la de C5 UCB-MSc. Por tanto, si una célula tiene una elevada capacidad de condrogénesis puede ser determinado comparando una cantidad de expresión de TPS-2 de la célula con una cantidad de expresión de TSP-2 de una célula de referencia, por ejemplo, una C5 UCB-MSc. Por ejemplo, cuando una célula de referencia (naive) cultivada en monocapa expresa TSP-2 hasta una cantidad mayor que 33 a 72 pg/ml por $1,0 \times 10^5$ células o cuando una célula de referencia cultivada en sedimento 1 día expresa TSP-2 hasta una cantidad mayor que 163 a 550 pg/ml por $1,0 \times 10^5$ células, se puede determinar que la capacidad de condrogénesis de la célula de referencia es superior a la de la C5 UCB-MSc. Este método puede ser usado para seleccionar MSCs adecuadas para ser usadas en condrogénesis.

Basándose en el patrón para seleccionar células adecuadas para ser usadas en condrogénesis, la célula de

referencia puede ser apropiadamente seleccionada por un experto en la técnica.

Como se ilustra en la figura 12, cuando una célula madre se cultivó en sedimento, la expresión de TSP-2 aumentó significativamente.

5 La figura 13 es un gráfico que muestra resultados de mediciones de cantidades de expresión de TSP-2 obtenidos mediante cultivo en sedimento de una C3 UCM-MSC y una C5 UCM-MSC durante 3 días, según una realización de la presente invención. Haciendo referencia a la figura 13, la cantidad de expresión de C5 UCM-MSC que tenía una
10 baja capacidad de diferenciación condrogénica fue más pequeña que la de la C3 UCM-MSC que tenía una elevada capacidad de diferenciación condrogénica incluso a medida que aumenta el tiempo de cultivo.

Por tanto, la cantidad de expresión de TSP-2 está asociada con la capacidad de diferenciación condrogénica de la UCB-MSC y la capacidad de diferenciación condrogénica las MSCs puede ser predicha midiendo la cantidad de
15 expresión de TSP-2.

La figura 26 es un gráfico que muestra resultados de medir un nivel de expresión de TSP-2 después de que una UCB-MSC y una BM-MSC con cultivadas en sedimento, según una realización de la presente invención. Haciendo
20 referencia a la figura 26, la UCB-MSC expresó un nivel significativamente mayor de TSP-2 que la BM-MSC. Esto indica que el grado de diferenciación condrogénica de la UCB-MSC es mejor que el de la BM-MSC.

Los resultados ilustrados en la figura 26 se obtuvieron como sigue. En primer lugar, una UCB-MSC y una BM-MSC que estaban siendo cultivadas en monocapas fueron tratadas con tripsina para ser separadas y la UCB-MSC y la
25 BM-MSC fueron puestas en suspensión cada una a una concentración de 5×10^5 células/ml en DMEM exento de suero y se cultivaron durante 24 horas. El medio usado fue un DMEM (que contenía dexametasona 100 nM, 50 $\mu\text{g/ml}$ de ascorbato-2-fosfato, 40 $\mu\text{g/ml}$ de L-prolina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de piruvato). Cada célula fue cultivada en sedimento y se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para formar un sedimento celular y el sedimento celular obtenido se cultivó durante 24 horas. La materia sobrenadante del cultivo obtenido se recogió y se midió el nivel de expresión de TSP-2 mediante ELISA.

30 EJEMPLO 7: Expresión de TSP-2 mediante UCB-MSC bajo condiciones de diferenciación y desdiferenciación condrogénica

Para confirmar la asociación de una cantidad de expresión de TSP-2 con diferenciación condrogénica, se midió la cantidad de expresión de TSP-2 mediante una UCB-MSC bajo condiciones de diferenciación y desdiferenciación
35 condrogénica.

(1) Expresión de TSP-2 por célula progenitora condrogénica bajo condiciones de diferenciación condrogénica

Una célula progenitora condrogénica se separó de un botón de extremidad de embrión de ratón. Se volvieron a
40 poner en suspensión 4×10^7 células/ml de la célula progenitora condrogénica separada en un medio (que contenía DMEM/F-12 (2:3), 10% (v/v) de FBS, 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin y 50 unidades/ml de penicilina) y cada uno de 15 μl de la célula progenitora condrogénica vuelta a poner en suspensión se hizo gotear en un plato de cultivo para que se uniera al mismo en una forma de manchas independientes. Seguidamente, la célula progenitora condrogénica en una forma de mancha se cultivó durante 6 días para inducir que cada mancha se diferenciara en forma de un
45 condrocito. Se midió una cantidad de expresión de TSP-2 usando RT-PCR, usando un RNA total aislado a partir de la célula en forma de una plantilla.

La figura 14 ilustra gráficos que muestran la cantidad de TSP-2 expresada por una célula progenitora condrogénica o un condrocito bajo condiciones de diferenciación y desdiferenciación, según una realización de la presente
50 invención. Haciendo referencia a A de la figura 14, la cantidad de expresión de TSP-2 aumentó con un tiempo de cultivo bajo condiciones diferentes.

(2) Expresión de TSP-2 por condrocito bajo condiciones de desdiferenciación condrogénica

Un condrocito se separó de una articulación de rodilla de un conejo de 2 semanas de edad. El condrocito separado se cultivó en un medio que contenía un DMEM, 10% (v/v) de FBS y 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina en presencia de 5
55 ng/ml de interleucina-1 β (IL-1 β) para inducir la desdiferenciación. La IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria que desdiferencia un condrocito, dando lugar a una pérdida de las propiedades del condrocito. La cantidad de expresión de TSP-2 se midió mediante RT-PCR usando un RNA total aislado a partir de la célula en forma de una plantilla.

Haciendo referencia a B de la figura 14, la cantidad de expresión de TSP-2 disminuyó con un tiempo de cultivo bajo
60 condiciones de desdiferenciación.

A partir de los resultados anteriormente descritos, se confirma que la expresión de TSP-2 está asociada con la diferenciación y desdiferenciación condrogénica de un condrocito.
65

EJEMPLO 8: Inducción de la diferenciación condrogénica de UCB-MSC por TSP-2 (no entra en el alcance de la presente invención)

Una UCB-MSC se cultivó en presencia de TSP-2 para inducir la diferenciación condrogénica. El medio usado fue el medio de cultivo condrogénico anteriormente descrito. Se añadió una TSP-2 recombinante (R&D System, Minneapolis, MN, USA) al medio de cultivo en una cantidad de 10 ng/ml a 500 ng/ml y el producto resultante se cultivó en sedimento. Una concentración inicial de la UCB-MSC fue de 5×10^5 células/ml. Después del procedimiento de cultivo, se realizó una RT-PCR usando un RNA total aislado a partir de la célula como plantilla y usando cebadores específicos para un marcador de condrocitos (por ejemplo, colágeno de tipo II (Col IIA1), agrecano (Acan), Sox-9 y TSP-2), y condrocito hipertrófico y marcadores óseos (por ejemplo, Col IA1 y Col XA1) para medir una cantidad de expresión de mRNA de estos marcadores.

Las figuras 15 a 17 son gráficos que muestran una cantidad de expresión de una proteína marcadora de una UCB-MSC cultivada en presencia de TSP-2, según realizaciones de la presente invención. Haciendo referencia a las figuras 15 a 17, las expresiones de colágeno de tipo II (Col IIA1), agrecano (Acan) y Sox-9 aumentaron dependiendo de su concentración 1 semana después de la inducción de la diferenciación condrogénica, mientras que la expresiones de Col IA1 y Col XA1 disminuyeron o no fueron exhibidas con un tiempo de cultivo.

Por tanto, se confirma que la TSP-2 externamente añadida estimula la diferenciación condrogénica de la UCB-MSC.

EJEMPLO 9: Inducción de diferenciación condrogénica de UCB-MSC bajo condiciones de inhibición de expresión de TSP-2

Una UCB-MSC se cultivó en un medio de cultivo condrogénico bajo condiciones de inhibición de la expresión de TSP-2 para inducir la diferenciación condrogénica.

Se añadió RNA de interferencia pequeña (siRNA) (Bioneer, Daejeon, Korea, secuencia de sentido: SEQ ID NO:9, secuencia de anti-sentido: SEQ ID NO: 10) con una secuencia complementaria a la de mRNA de TSP-2 a un medio en una concentración de 33 nM para inhibir la expresión de TSP-2. El medio usado fue el medio de cultivo condrogénico anteriormente descrito y la UCB-MSC fue cultivada en sedimento. Una concentración inicial de la UCB-MSC fue de 5×10^5 células/ml y el procedimiento de cultivo se realizó durante 7 días. La cantidad de expresión de TSP-2 se midió usando RT-PCR que usó un RNA total extraído de la UCB-MSC y usando un cebador específico de TSP-2, o la cantidad de expresión de TSP-2 en la materia sobrenadante del cultivo obtenido se midió mediante ELISA. Las expresiones de Col IIA1 y agrecano se midieron usando RT-PCR.

La figura 18 ilustra gráficos que muestran el grado de diferenciación condrogénica de una UCB-MSC cultivada en un medio condrogénico bajo condiciones de inhibición de la expresión de TSP-2, según una realización de la presente invención. Haciendo referencia a la figura 18, en la UCB-MSC cultivada bajo condiciones de inhibición de la expresión de TSP-2, es decir, en presencia de siRNA de TSP-2, las expresiones de los marcadores de condrocitos, es decir, Col IIA1 y agrecano disminuyeron significativamente. Esto indica que la TSP-2 induce o estimula la diferenciación condrogénica de la UCB-MSC. En la figura 18, A muestra los resultados de medir la concentración de TSP-2 mediante RT-PCR, B muestra los resultados de medir la concentración de TSP-2 mediante ELISA y C y D muestran los resultados de RT-PCR de Col IIA1 y agrecano respectivamente.

EJEMPLO 10: Nivel de TSP-2 en plasma sanguíneo de paciente con osteoartritis

Se recogió sangre 15 personas normales y 28 pacientes con osteoartritis y el nivel de TSP-2 en cada plasma sanguíneo se midió mediante ELISA.

La figura 19 es un gráfico que muestra los niveles de TSP-2 en plasma sanguíneo de una persona normal y un paciente con osteoartritis, según una realización de la presente invención. Haciendo referencia a la figura 19, el nivel de TSP-2 era mayor en el plasma sanguíneo del paciente con osteoartritis que en el plasma sanguíneo de la persona normal. Esto indica que el nivel de TSP-2 en sangre puede actuar como un marcador para diagnosticar artritis. Esto indica también que el nivel de TSP-2 en sangre puede actuar como un marcador para diagnosticar enfermedades relacionadas con la diferenciación condrogénica, además de la artritis.

EJEMPLO 11: Expresión de TSP-1 en UCB-MSC por líquido articular de paciente con artritis (no entra en el alcance de la presente invención)

Se confirmó el efecto de un líquido articular de un paciente con artritis sobre la expresión de TSP-1 en una UCB-MSC.

Una UCB-MSC se cultivó en presencia de un líquido articular de un paciente con artritis. La UCB-MSC se cultivó en un medio que contenía MEM- α , 10 % (v/v) de FBS y 50 μ g/ml de gentamicina durante 5 a 6 días. El líquido articular de la cavidad articular se añadió al medio cuando la UCB-MSC se cultivó hasta un nivel de 70-80% del área de un recipiente de cultivo. El líquido articular del paciente con artritis se añadió a una concentración de 20% (v/v) después

de que el medio con UCB-MSC que estaba siendo cultivado en el mismo fuera cambiado con un medio que contenía MEM- α y 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, y el producto resultante se cultivó adicionalmente durante 3 horas. El cultivo obtenido se usó como una muestra de análisis. Además, como un testigo, se usó un cultivo de UCB-MSC cultivado en un estado en el que el líquido articular no fue añadido al mismo y/o no se cultivó un medio con el líquido articular añadido a una concentración de 20% (v/v) en el que no fue cultivada UCB-MSC. El líquido articular se obtuvo a partir de un paciente con artritis degenerativa.

Las figuras 20 y 21 son gráficos que muestran cantidades de expresión de TSP-1 de una UCB-MSC en presencia de un líquido articular de un paciente con artritis, según realizaciones de la presente invención. En la figura 20, MSC representa solamente que la UCB-MSC fue cultivada sin el líquido articular y JF#1, JF#2, y JF#3 representan respectivamente fluidos articulares de diferentes pacientes y los resultados de un experimento por triplicado. En la figura 20, la cantidad de expresión de TSP-1 se midió usando una RT-PCR que usaba un RNA total extraído de la UCM-MSC como una plantilla y usando un cebador específico de TSP-1.

En la figura 21, JF representa un líquido articular de un paciente con artritis. En la figura 21, la cantidad de expresión de TSP-1 en la materia sobrenadante del cultivo obtenido de la UCB-MSC se midió mediante ELISA. Haciendo referencia a la figura 21, la UCB-MSC cultivada en presencia de un líquido articular de un paciente con artritis expresó una cantidad mayor de TSP-1 que la de la UCB-MSC cultivada en un medio que excluía el líquido articular de un paciente con artritis o en el cultivo obtenido en un medio que incluía solamente 20% de líquido articular de un paciente con artritis.

EJEMPLO 12: Asociación de IL-17BR con capacidad de diferenciación condrogénica

Tipos de UCB-MSC que tenían diferentes capacidades de diferenciación condrogénica se cultivaron en sedimentos en un medio de diferenciación condrogénica durante 1 semana para inducir la diferenciación condrogénica. La cantidad de mRNA de IL-17BR se midió usando una RT-PCR que usaba un RNA total obtenido lisando la UCB-MSC como una plantilla.

La figura 22 es un gráfico que muestra los resultados de analizar la cantidad de mRNA de IL-17BR obtenido lisando una UCB-MSC diferenciada en forma de cartílago mediante una RT-PCR, según una realización de la presente invención.

Haciendo referencia a la figura 22, un nivel de expresión de mRNA de IL-17BR varió según la capacidad de diferenciación condrogénica de la UCB-MSC. Es decir, la UCB-MSC C2 y C3 expresaban mRNA de IL-17BR y el grado de capacidad de diferenciación condrogénica fue 8,9 veces mayor en la C2 UCB-MSC que en la C3 UCB-MSC. Por otra parte, la C5 UCB-MSC que tenía una baja capacidad de diferenciación condrogénica no expresó mRNA de IL-17BR.

Ejemplo 13: El efecto del líquido articular del paciente con artritis sobre la expresión de HB-EGF (no entra dentro del alcance de la presente invención)

Se cultivó una UCB-MSC en un medio al que se añadió un líquido articular de un paciente con artritis a una concentración de 10% (v/v) usando un método similar al usado en el Ejemplo 1, durante 6 horas, y se midió la cantidad de mRNA de HB-EGF mediante RT-PCR usando un RNA total obtenido de la UCB-MSC como una plantilla. Como testigo, se usó una UCB-MSC cultivada bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, excepto que un medio no incluyó el líquido articular de un paciente con artritis.

La figura 23 ilustra gráficos que muestran resultados de mediciones de mRNA de HB-EGF en una UCB-MSC cultivada en presencia de un líquido articular de un paciente con artritis, según una realización de la presente invención. En la figura 23, C3 y C5 representan tipos de UCB-MSC, BM-MSC representa una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea, BEAS-2B representa una célula epitelial bronquial derivada de pulmón y JF representa un líquido articular. Haciendo referencia a la figura 23, la expresión de HB-EGF en la UCB-MSC está significativamente aumentada por el líquido articular del paciente con artritis, mientras que no es significativa en la BM-MSC y en la BEAS-2B. La UCB-MSC expresó HB-EGF por el líquido articular del paciente con artritis hasta una cantidad de 2 veces (C5 UCB-MSC) hasta 8,4 veces (C3 UCB-MSC) mayor que la de HB-EGF en la BM-MSC.

Esto indica que la expresión de HB-EGF es específicamente inducida en la UCB-MSC por el líquido articular del paciente con artritis. Esto indica también que la UCB-MSC puede expresar una cantidad significativamente mayor de HB-EGF que la HB-EGF en la BM-MSC.

Además, se midió un grado de expresión de HB-EGF por una UCB-MSC y en una UCB-MSC por el líquido articular del paciente con artritis. A este respecto, se usaron UCB-MSCs C3 y C5 y se usaron los fluidos articulares recogidos de 3 pacientes (JF1, JF5 Y JF11). Las condiciones de cultivo y las condiciones de las mediciones de HB-EGF son las mismas que las anteriormente descritas en relación con la figura 20. La Tabla 1 muestra resultados de analizar un grado de expresión de HB-EGF por una UCB-MSC y en una UCB-MSC por los fluidos articulares de pacientes con artritis, usando RT-PCR.

Tabla 1

HB-EGF	MSC	MSC+JF1	MSC+JF5	MSC+JF11
C5 UCB-MSC	1,00	9,80	26,60	9,20
C3 UCB-MSC	1,00	15,00	46,90	17,50

5 Haciendo referencia a la Tabla 1, cuando la UCB-MSC se cultivó con el líquido articular de los pacientes con artritis, expresó HB-EGF hasta una cantidad de 9,2 a 46,9 veces mayor que la de HB-EGF en el testigo.

EJEMPLO 14: Expresión de HB-EGF por UCB-MSC bajo condiciones de muerte de condrocitos (no entra en el alcance de la presente invención)

10 Se analizó un grado de expresión de HB-EGF por una UCB-MSC bajo condiciones de muerte de condrocitos. En primer lugar, se separó un condrocito de una articulación de conejo de 2 semanas de edad. El condrocito separado se cultivó en un medio que contenía DMEM y 10% /v/v de FBS en una placa de 6 pocillos durante 5 días, y el condrocito que estaba siendo cultivado se usó en un experimento. El cultivo de la UCB-MSC se realizó en presencia de nitroprusiato de sodio (SNP) o el condrocito derivado de ratón durante 24 horas. A este respecto, se añadió SNP
15 500 µM en el medio. El SNP es un compuesto que produce óxido nítrico, y se conoce que induce la muerte de condrocitos. La adición de SNP se realiza para simular condiciones que surgen en un paciente con artritis in vitro. Además, el condrocito derivado de conejo y la UCB-MSC fueron respectivamente co-cultivados en una parte inferior y una parte superior de una cámara transwell (BD Falcon, San Jose, California, USA, inserciones de cultivos celulares para placas de 6 pocillos, 0,4µm, membrana de PET translúcida).

20 Se midió si el HB-EGF se expresa o no realizando una inmunotransferencia de forma que la UCB-MSC se separara del cultivo y se lisara y seguidamente se usaron un anticuerpo anti-HB-EGF y un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo anti-HB-EGF con un marcador de fluorescencia con respecto a la misma concentración del lisado.

25 La figura 24 es un diagrama que muestra una cantidad de expresión de HB-EGF en una UCB-MSC cultivada bajo condiciones de muerte de condrocitos, según una realización de la presente invención. Haciendo referencia a la figura 24, la UCB-MSC no expresó HB-EGF cuando fue cultivada bajo condiciones de apoptosis de condrocitos, mientras UCB-MSC expresó HB-EGD cuando conjuntamente cultivada con el condrocito derivado de conejo.

30 Además, el condrocito derivado de conejo se cultivó en presencia de HB-EGF y seguidamente se confirmó si se protegió el condrocito derivado de conejo. La figura 25 ilustra imágenes de microscopio óptico que muestran resultados de observaciones de condrocito derivado de conejo en presencia de HB-EGF, según una realización de la presente invención. Haciendo referencia a la figura 25, el condrocito derivado de conejo murió dependiendo de la
35 concentración de SNP en el testigo (parte superior), mientras que la apoptosis del condrocito derivado de conejo cultivado en un medio que contenía 50 ng/ml de HB-EGF fue inhibido dependiendo de la concentración de SNP. Esto indica que la apoptosis del condrocito derivado de conejo provocada por SNP es inhibida por HB-EGF.

Listado de secuencias

- 40 <110> MEDIPOST CO., LTD.
- <120> TSP-1, TSP-2, IL-17BR and HB-EGF asociado con la actividad de la célula madre y su uso
- 45 <130> PX034949US
- <150> KR10-2010-0045128
- <151> 2010-05-13
- 50 <150> US61/182484
- <151> 2009-05-29
- 55 <160> 10
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- 60 <211> 1172

ES 2 559 235 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 1

```

Met Val Trp Arg Leu Val Leu Leu Ala Leu Trp Val Trp Pro Ser Thr
 1          5          10          15
Gln Ala Gly His Gln Asp Lys Asp Thr Thr Phe Asp Leu Phe Ser Ile
          20          25
Ser Asn Ile Asn Arg Lys Thr Ile Gly Ala Lys Gln Phe Arg Gly Pro
 35          40          45
Asp Pro Gly Val Pro Ala Tyr Arg Phe Val Arg Phe Asp Tyr Ile Pro
 50          55          60
Pro Val Asn Ala Asp Asp Leu Ser Lys Ile Thr Lys Ile Met Arg Gln
 65          70          75          80
Lys Glu Gly Phe Phe Leu Thr Ala Gln Leu Lys Gln Asp Gly Lys Ser
          85          90          95
Arg Gly Thr Leu Leu Ala Leu Glu Gly Pro Gly Leu Ser Gln Arg Gln
          100          105          110
Phe Glu Ile Val Ser Asn Gly Pro Ala Asp Thr Leu Asp Leu Thr Tyr
 115          120          125
Trp Ile Asp Gly Thr Arg His Val Val Ser Leu Glu Asp Val Gly Leu
 130          135          140
Ala Asp Ser Gln Trp Lys Asn Val Thr Val Gln Val Ala Gly Glu Thr
 145          150          155          160
Tyr Ser Leu His Val Gly Cys Asp Leu Ile Asp Ser Phe Ala Leu Asp
          165          170          175
Glu Pro Phe Tyr Glu His Leu Gln Ala Glu Lys Ser Arg Met Tyr Val
          180          185          190
Ala Lys Gly Ser Ala Arg Glu Ser His Phe Arg Gly Leu Leu Gln Asn
 195          200          205
Val His Leu Val Phe Glu Asn Ser Val Glu Asp Ile Leu Ser Lys Lys
 210          215          220
Gly Cys Gln Gln Gly Gln Gly Ala Glu Ile Asn Ala Ile Ser Glu Asn
 225          230          235          240

```

ES 2 559 235 T3

Thr Glu Thr Leu Arg Leu Gly Pro His Val Thr Thr Glu Tyr Val Gly
 245 250 255
 Pro Ser Ser Glu Arg Arg Pro Glu Val Cys Glu Arg Ser Cys Glu Glu
 260 265 270
 Leu Gly Asn Met Val Gln Glu Leu Ser Gly Leu His Val Leu Val Asn
 275 280 285
 Gln Leu Ser Glu Asn Leu Lys Arg Val Ser Asn Asp Asn Gln Phe Leu
 290 295 300
 Trp Glu Leu Ile Gly Gly Pro Pro Lys Thr Arg Asn Met Ser Ala Cys
 305 310 315
 Trp Gln Asp Gly Arg Phe Phe Ala Glu Asn Glu Thr Trp Val Val Asp
 325 330 335
 Ser Cys Thr Thr Cys Thr Cys Lys Lys Phe Lys Thr Ile Cys His Gln
 340 345 350
 Ile Thr Cys Pro Pro Ala Thr Cys Ala Ser Pro Ser Phe Val Glu Gly
 355 360 365
 Glu Cys Cys Pro Ser Cys Leu His Ser Val Asp Gly Glu Glu Gly Trp
 370 375 380
 Ser Pro Trp Ala Glu Trp Thr Gln Cys Ser Val Thr Cys Gly Ser Gly
 385 390 395 400
 Thr Gln Gln Arg Gly Arg Ser Cys Asp Val Thr Ser Asn Thr Cys Leu
 405 410 415
 Gly Pro Ser Ile Gln Thr Arg Ala Cys Ser Leu Ser Lys Cys Asp Thr
 420 425 430
 Arg Ile Arg Gln Asp Gly Gly Trp Ser His Trp Ser Pro Trp Ser Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Thr Cys Gly Val Gly Asn Ile Thr Arg Ile Arg Leu Cys
 450 455 460
 Asn Ser Pro Val Pro Gln Met Gly Gly Lys Asn Cys Lys Gly Ser Gly
 465 470 475 480
 Arg Glu Thr Lys Ala Cys Gln Gly Ala Pro Cys Pro Ile Asp Gly Arg
 485 490 495
 Trp Ser Pro Trp Ser Pro Trp Ser Ala Cys Thr Val Thr Cys Ala Gly
 500 505 510
 Gly Ile Arg Glu Arg Thr Arg Val Cys Asn Ser Pro Glu Pro Gln Tyr
 515 520 525
 Gly Gly Lys Ala Cys Val Gly Asp Val Gln Glu Arg Gln Met Cys Asn
 530 535 540
 Lys Arg Ser Cys Pro Val Asp Gly Cys Leu Ser Asn Pro Cys Phe Pro
 545 550 555 560
 Gly Ala Gln Cys Ser Phe Pro Asp Gly Ser Trp Ser Cys Gly Ser
 565 570 575
 Cys Pro Val Gly Phe Leu Gly Asn Gly Thr His Cys Glu Asp Leu Asp
 580 585 590
 Glu Cys Ala Leu Val Pro Asp Ile Cys Phe Ser Thr Ser Lys Val Pro
 595 600 605

ES 2 559 235 T3

Arg Cys Val Asn Thr Gln Pro Gly Phe His Cys Leu Pro Cys Pro Pro
 610 615 620
 Arg Tyr Arg Gly Asn Gln Pro Val Gly Val Gly Leu Glu Ala Ala Lys
 625 630 640
 Thr Glu Lys Gln Val Cys Glu Pro Glu Asn Pro Cys Lys Asp Lys Thr
 645 650 655
 His Asn Cys His Lys His Ala Glu Cys Ile Tyr Leu Gly His Phe Ser
 660 665 670
 Asp Pro Met Tyr Lys Cys Glu Cys Gln Thr Gly Tyr Ala Gly Asp Gly
 675 680 685
 Leu Ile Cys Gly Glu Asp Ser Asp Leu Asp Gly Trp Pro Asn Leu Asn
 690 695 700
 Leu Val Cys Ala Thr Asn Ala Thr Tyr His Cys Ile Lys Asp Asn Cys
 705 710 715 720
 Pro His Leu Pro Asn Ser Gly Gln Glu Asp Phe Asp Lys Asp Gly Ile
 725 730 735
 Gly Asp Ala Cys Asp Asp Asp Asp Asp Asn Asp Gly Val Thr Asp Glu
 740 745 750
 Lys Asp Asn Cys Gln Leu Leu Phe Asn Pro Arg Gln Ala Asp Tyr Asp
 755 760 765
 Lys Asp Glu Val Gly Asp Arg Cys Asp Asn Cys Pro Tyr Val His Asn
 770 775 780
 Pro Ala Gln Ile Asp Thr Asp Asn Asn Gly Glu Gly Asp Ala Cys Ser
 785 790 800
 Val Asp Ile Asp Gly Asp Asp Val Phe Asn Glu Arg Asp Asn Cys Pro
 805 810 815
 Tyr Val Tyr Asn Thr Asp Gln Arg Asp Thr Asp Gly Asp Gly Val Gly
 820 825 830
 Asp His Cys Asp Asn Cys Pro Leu Val His Asn Pro Asp Gln Thr Asp
 835 840 845
 Val Asp Asn Asp Leu Val Gly Asp Gln Cys Asp Asn Asn Glu Asp Ile
 850 855 860
 Asp Asp Asp Gly His Gln Asn Asn Gln Asp Asn Cys Pro Tyr Ile Ser
 865 870 875 880
 Asn Ala Asn Gln Ala Asp His Asp Arg Asp Gly Gln Gly Asp Ala Cys
 885 890 895
 Asp Pro Asp Asp Asp Asn Asp Gly Val Pro Asp Asp Arg Asp Asn Cys
 900 905 910
 Arg Leu Val Phe Asn Pro Asp Gln Glu Asp Leu Asp Gly Asp Gly Arg
 915 920 925
 Gly Asp Ile Cys Lys Asp Asp Phe Asp Asn Asp Asn Ile Pro Asp Ile
 930 935 940
 Asp Asp Val Cys Pro Glu Asn Asn Ala Ile Ser Glu Thr Asp Phe Arg
 945 950 955 960
 Asn Phe Gln Met Val Pro Leu Asp Pro Lys Gly Thr Thr Gln Ile Asp

ES 2 559 235 T3

965 970 975
 Pro Asn Trp Val Ile Arg His Gln Gly Lys Glu Leu Val Gln Thr Ala
 980 985 990
 Asn Ser Asp Pro Gly Ile Ala Val Gly Phe Asp Glu Phe Gly Ser Val
 995 1000 1005
 Asp Phe Ser Gly Thr Phe Tyr Val Asn Thr Asp Arg Asp Asp Asp Tyr
 1010 1015 1020
 Ala Gly Phe Val Phe Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Arg Phe Tyr Val Val
 1025 1030 1035 1040
 Met Trp Lys Gln Val Thr Gln Thr Tyr Trp Glu Asp Gln Pro Thr Arg
 1045 1050 1055
 Ala Tyr Gly Tyr Ser Gly Val Ser Leu Lys Val Val Asn Ser Thr Thr
 1060 1065 1070
 Gly Thr Gly Glu His Leu Arg Asn Ala Leu Trp His Thr Gly Asn Thr
 1075 1080 1085
 Pro Gly Gln Val Arg Thr Leu Trp His Asp Pro Arg Asn Ile Gly Trp
 1090 1095 1100
 Lys Asp Tyr Thr Ala Tyr Arg Trp His Leu Thr His Arg Pro Lys Thr
 1105 1110 1115 1120
 Gly Tyr Ile Arg Val Leu Val His Glu Gly Lys Gln Val Met Ala Asp
 1125 1130 1135
 Ser Gly Pro Ile Tyr Asp Gln Thr Tyr Ala Gly Gly Arg Leu Gly Leu
 1140 1145 1150
 Phe Val Phe Ser Gln Glu Met Val Tyr Phe Ser Asp Leu Lys Tyr Glu
 1155 1160 1165
 Cys Arg Asp Ile
 1170

<210> 2

5 <211> 1172

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 2

Met Leu Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Gly Ile Gly Pro Arg Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Gly Asp His Val Lys Asp Thr Ser Phe Asp Leu Phe Ser Ile
 20 25 30
 Ser Asn Ile Asn Arg Lys Thr Ile Gly Ala Lys Gln Phe Arg Gly Pro
 35 40 45
 Asp Pro Gly Val Pro Ala Tyr Arg Phe Val Arg Phe Asp Tyr Ile Pro
 50 55 60
 Pro Val Asn Thr Asp Asp Leu Asn Arg Ile Val Lys Leu Ala Arg Arg
 65 70 75 80
 Lys Glu Gly Phe Phe Leu Thr Ala Gln Leu Lys Gln Asp Arg Lys Ser
 85 90 95
 Arg Gly Thr Leu Val Leu Glu Gly Pro Gly Thr Ser Gln Arg Gln
 100 105 110

ES 2 559 235 T3

Phe Glu Ile Val Ser Asn Gly Pro Gly Asp Thr Leu Asp Leu Asn Tyr
 115 120 125
 Trp Val Glu Gly Asn Gln His Thr Asn Phe Leu Glu Asp Val Gly Leu
 130 135 140
 Ala Asp Ser Gln Trp Lys Asn Val Thr Val Gln Val Ala Ser Asp Thr
 145 150 155 160
 Tyr Ser Leu Tyr Val Gly Cys Asp Leu Ile Asp Ser Val Thr Leu Glu
 165 170 175
 Glu Pro Phe Tyr Glu Gln Leu Glu Val Asp Arg Ser Arg Met Tyr Val
 180 185 190
 Ala Lys Gly Ala Ser Arg Glu Ser His Phe Arg Gly Leu Leu Gln Asn
 195 200 205
 Val His Leu Val Phe Ala Asp Ser Val Glu Asp Ile Leu Ser Lys Lys
 210 215 220
 Gly Cys Gln His Ser Gln Gly Ala Glu Val Asn Thr Ile Ser Glu His
 225 230 235 240
 Thr Glu Thr Leu His Leu Ser Pro His Ile Thr Thr Asp Leu Val Val
 245 250 255
 Gln Gly Val Glu Lys Ala Gln Glu Val Cys Thr His Ser Cys Glu Glu
 260 265 270
 Leu Ser Asn Met Met Asn Glu Leu Ser Gly Leu His Val Met Val Asn
 275 280 285
 Gln Leu Ser Lys Asn Leu Glu Arg Val Ser Ser Asp Asn Gln Phe Leu
 290 295 300
 Leu Glu Leu Ile Gly Gly Pro Leu Lys Thr Arg Asn Met Ser Ala Cys
 305 310 315 320
 Val Gln Glu Gly Arg Ile Phe Ala Glu Asn Glu Thr Trp Val Val Asp
 325 330 335
 Ser Cys Thr Thr Cys Thr Cys Lys Lys Phe Lys Thr Val Cys His Gln
 340 345 350
 Ile Thr Cys Ser Pro Ala Thr Cys Ala Asn Pro Ser Phe Val Glu Gly
 355 360 365
 Glu Cys Cys Pro Ser Cys Ser His Ser Ala Asp Ser Asp Glu Gly Trp
 370 375 380
 Ser Pro Trp Ala Glu Trp Thr Glu Cys Ser Val Thr Cys Gly Ser Gly
 385 390 395 400
 Thr Gln Gln Arg Gly Arg Ser Cys Asp Val Thr Ser Asn Thr Cys Leu
 405 410 415
 Gly Pro Ser Ile Gln Thr Arg Thr Cys Ser Leu Gly Lys Cys Asp Thr
 420 425 430
 Arg Ile Arg Gln Asn Gly Gly Trp Ser His Trp Ser Pro Trp Ser Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Thr Cys Gly Val Gly Asn Val Thr Arg Ile Arg Leu Cys
 450 455 460
 Asn Ser Pro Val Pro Gln Met Gly Gly Lys Asn Cys Lys Gly Ser Gly

ES 2 559 235 T3

Asp His Cys Asp Asn Cys Pro Leu Met His Asn Pro Asp Gln Ile Asp
 835 840 845
 Gln Asp Asn Asp Leu Val Gly Asp Gln Cys Asp Asn Asn Glu Asp Ile
 850 855 860
 Asp Asp Asp Gly His Gln Asn Asn Gln Asp Asn Cys Pro Tyr Ile Ser
 865 870 875 880
 Asn Ser Asn Gln Ala Asp His Asp Asn Asp Gly Lys Gly Asp Ala Cys
 885 890 895
 Asp Ser Asp Asp Asp Asn Asp Gly Val Pro Asp Asp Arg Asp Asn Cys
 900 905 910
 Arg Leu Val Phe Asn Pro Asp Gln Glu Asp Ser Asp Gly Asp Gly Arg
 915 920 925
 Gly Asp Ile Cys Lys Asp Asp Phe Asp Asn Asp Asn Val Pro Asp Ile
 930 935 940
 Asp Asp Val Cys Pro Glu Asn Asn Ala Ile Thr Glu Thr Asp Phe Arg
 945 950 955 960
 Asn Phe Gln Met Val Pro Leu Asp Pro Lys Gly Thr Thr Gln Ile Asp
 965 970 975
 Pro Asn Trp Val Ile Arg His Gln Gly Lys Glu Leu Val Gln Thr Ala
 980 985 990
 Asn Ser Asp Pro Gly Ile Ala Val Gly Phe Asp Glu Phe Gly Ser Val
 995 1000 1005
 Asp Phe Ser Gly Thr Phe Tyr Val Asn Thr Asp Arg Asp Asp Asp Tyr
 1010 1015 1020
 Ala Gly Phe Val Phe Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Arg Phe Tyr Val Val
 1025 1030 1035 1040
 Met Trp Lys Gln Val Thr Gln Thr Tyr Trp Glu Asp Lys Pro Ser Arg
 1045 1050 1055
 Ala Tyr Gly Tyr Ser Gly Val Ser Leu Lys Val Val Asn Ser Thr Thr
 1060 1065 1070
 Gly Thr Gly Glu His Leu Arg Asn Ala Leu Trp His Thr Gly Asn Thr
 1075 1080 1085
 Glu Gly Gln Val Arg Thr Leu Trp His Asp Pro Lys Asn Ile Gly Trp
 1090 1095 1100
 Lys Asp Tyr Thr Ala Tyr Arg Trp His Leu Ile His Arg Pro Lys Thr
 1105 1110 1115 1120
 Gly Tyr Met Arg Val Leu Val His Glu Gly Lys Gln Val Met Ala Asp
 1125 1130 1135
 Ser Gly Pro Ile Tyr Asp Gln Thr Tyr Ala Gly Gly Arg Leu Gly Leu
 1140 1145 1150
 Phe Val Phe Ser Gln Glu Met Val Tyr Phe Ser Asp Leu Lys Tyr Glu
 1155 1160 1165
 Cys Arg Asp Ala
 1170

<210> 3

5 <211> 1170

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 3

ES 2 559 235 T3

Met Gly Leu Ala Trp Gly Leu Gly Val Leu Phe Leu Met His Val Cys
 1 5 10 15
 Gly Thr Asn Arg Ile Pro Glu Ser Gly Gly Asp Asn Ser Val Phe Asp
 20 25 30
 Ile Phe Glu Leu Thr Gly Ala Ala Arg Lys Gly Ser Gly Arg Arg Leu
 35 40 45
 Val Lys Gly Pro Asp Pro Ser Ser Pro Ala Phe Arg Ile Glu Asp Ala
 50 55 60
 Asn Leu Ile Pro Pro Val Pro Asp Asp Lys Phe Gln Asp Leu Val Asp
 65 70 75 80
 Ala Val Arg Ala Glu Lys Gly Phe Leu Leu Leu Ala Ser Leu Arg Gln
 85 90 95
 Met Lys Lys Thr Arg Gly Thr Leu Leu Ala Leu Glu Arg Lys Asp His
 100 105 110
 Ser Gly Gln Val Phe Ser Val Val Ser Asn Gly Lys Ala Gly Thr Leu
 115 120 125
 Asp Leu Ser Leu Thr Val Gln Gly Lys Gln His Val Val Ser Val Glu
 130 135 140
 Glu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Gln Trp Lys Ser Ile Thr Leu Phe Val
 145 150 155 160
 Gln Glu Asp Arg Ala Gln Leu Tyr Ile Asp Cys Glu Lys Met Glu Asn
 165 170 175
 Ala Glu Leu Asp Val Pro Ile Gln Ser Val Phe Thr Arg Asp Leu Ala
 180 185 190
 Ser Ile Ala Arg Leu Arg Ile Ala Lys Gly Gly Val Asn Asp Asn Phe
 195 200 205
 Gln Gly Val Leu Gln Asn Val Arg Phe Val Phe Gly Thr Thr Pro Glu
 210 215 220
 Asp Ile Leu Arg Asn Lys Gly Cys Ser Ser Ser Thr Ser Val Leu Leu
 225 230 235 240
 Thr Leu Asp Asn Asn Val Val Asn Gly Ser Ser Pro Ala Ile Arg Thr
 245 250 255
 Asn Tyr Ile Gly His Lys Thr Lys Asp Leu Gln Ala Ile Cys Gly Ile
 260 265 270
 Ser Cys Asp Glu Leu Ser Ser Met Val Leu Glu Leu Arg Gly Leu Arg
 275 280 285
 Thr Ile Val Thr Thr Leu Gln Asp Ser Ile Arg Lys Val Thr Glu Glu
 290 295 300
 Asn Lys Glu Leu Ala Asn Glu Leu Arg Arg Pro Pro Leu Cys Tyr His
 305 310 315 320
 Asn Gly Val Gln Tyr Arg Asn Asn Glu Glu Trp Thr Val Asp Ser Cys
 325 330 335

ES 2 559 235 T3

Thr Glu Cys His Cys Gln Asn Ser Val Thr Ile Cys Lys Lys Val Ser
 340 345 350
 Cys Pro Ile Met Pro Cys Ser Asn Ala Thr Val Pro Asp Gly Glu Cys
 355 360 365
 Cys Pro Arg Cys Trp Pro Ser Asp Ser Ala Asp Asp Gly Trp Ser Pro
 370 375 380
 Trp Ser Glu Trp Thr Ser Cys Ser Thr Ser Cys Gly Asn Gly Ile Gln
 385 390 395 400
 Gln Arg Gly Arg Ser Cys Asp Ser Leu Asn Asn Arg Cys Glu Gly Ser
 405 410 415
 Ser Val Gln Thr Arg Thr Cys His Ile Gln Glu Cys Asp Lys Arg Phe
 420 425 430
 Lys Gln Asp Gly Gly Trp Ser His Trp Ser Pro Trp Ser Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Thr Cys Gly Asp Gly Val Ile Thr Arg Ile Arg Leu Cys Asn Ser
 450 455 460
 Pro Ser Pro Gln Met Asn Gly Lys Pro Cys Glu Gly Glu Ala Arg Glu
 465 470 475 480
 Thr Lys Ala Cys Lys Lys Asp Ala Cys Pro Ile Asn Gly Gly Trp Gly
 485 490 495
 Pro Trp Ser Pro Trp Asp Ile Cys Ser Val Thr Cys Gly Gly Gly Val
 500 505 510
 Gln Lys Arg Ser Arg Leu Cys Asn Asn Pro Thr Pro Gln Phe Gly Gly
 515 520 525
 Lys Asp Cys Val Gly Asp Val Thr Glu Asn Gln Ile Cys Asn Lys Gln
 530 535 540
 Asp Cys Pro Ile Asp Gly Cys Leu Ser Asn Pro Cys Phe Ala Gly Val
 545 550 555 560
 Lys Cys Thr Ser Tyr Pro Asp Gly Ser Trp Lys Cys Gly Ala Cys Pro
 565 570 575
 Pro Gly Tyr Ser Gly Asn Gly Ile Gln Cys Thr Asp Val Asp Glu Cys
 580 585 590
 Lys Glu Val Pro Asp Ala Cys Phe Asn His Asn Gly Glu His Arg Cys
 595 600 605
 Glu Asn Thr Asp Pro Gly Tyr Asn Cys Leu Pro Cys Pro Pro Arg Phe
 610 615 620
 Thr Gly Ser Gln Pro Phe Gly Gln Gly Val Glu His Ala Thr Ala Asn
 625 630 635 640
 Lys Gln Val Cys Lys Pro Arg Asn Pro Cys Thr Asp Gly Thr His Asp
 645 650 655
 Cys Asn Lys Asn Ala Lys Cys Asn Tyr Leu Gly His Tyr Ser Asp Pro
 660 665 670
 Met Tyr Arg Cys Glu Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Gly Asn Gly Ile Ile
 675 680 685
 Cys Gly Glu Asp Thr Asp Leu Asp Gly Trp Pro Asn Glu Asn Leu Val
 690 695 700

ES 2 559 235 T3

Cys Val Ala Asn Ala Thr Tyr His Cys Lys Lys Asp Asn Cys Pro Asn
 705 710 715 720
 Leu Pro Asn Ser Gly Gln Glu Asp Tyr Asp Lys Asp Gly Ile Gly Asp
 725 730 735
 Ala Cys Asp Asp Asp Asp Asn Asp Lys Ile Pro Asp Asp Arg Asp
 740 745 750
 Asn Cys Pro Phe His Tyr Asn Pro Ala Gln Tyr Asp Tyr Asp Arg Asp
 755 760 765
 Asp Val Gly Asp Arg Cys Asp Asn Cys Pro Tyr Asn His Asn Pro Asp
 770 775 780
 Gln Ala Asp Thr Asp Asn Asn Gly Glu Gly Asp Ala Cys Ala Ala Asp
 785 790 795 800
 Ile Asp Gly Asp Gly Ile Leu Asn Glu Arg Asp Asn Cys Gln Tyr Val
 805 810 815
 Tyr Asn Val Asp Gln Arg Asp Thr Asp Met Asp Gly Val Gly Asp Gln
 820 825 830
 Cys Asp Asn Cys Pro Leu Glu His Asn Pro Asp Gln Leu Asp Ser Asp
 835 840 845
 Ser Asp Arg Ile Gly Asp Thr Cys Asp Asn Asn Gln Asp Ile Asp Glu
 850 855 860
 Asp Gly His Gln Asn Asn Leu Asp Asn Cys Pro Tyr Val Pro Asn Ala
 865 870 875 880
 Asn Gln Ala Asp His Asp Lys Asp Gly Lys Gly Asp Ala Cys Asp His
 885 890 895
 Asp Asp Asp Asn Asp Gly Ile Pro Asp Asp Lys Asp Asn Cys Arg Leu
 900 905 910
 Val Pro Asn Pro Asp Gln Lys Asp Ser Asp Gly Asp Gly Arg Gly Asp
 915 920 925
 Ala Cys Lys Asp Asp Phe Asp His Asp Ser Val Pro Asp Ile Asp Asp
 930 935 940
 Ile Cys Pro Glu Asn Val Asp Ile Ser Glu Thr Asp Phe Arg Arg Phe
 945 950 955 960
 Gln Met Ile Pro Leu Asp Pro Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Pro Asn
 965 970 975
 Trp Val Val Arg His Gln Gly Lys Glu Leu Val Gln Thr Val Asn Cys
 980 985 990
 Asp Pro Gly Leu Ala Val Gly Tyr Asp Glu Phe Asn Ala Val Asp Phe
 995 1000 1005
 Ser Gly Thr Phe Phe Ile Asn Thr Glu Arg Asp Asp Asp Tyr Ala Gly
 1010 1015 1020
 Phe Val Phe Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Arg Phe Tyr Val Val Met Trp
 1025 1030 1035 1040
 Lys Gln Val Thr Gln Ser Tyr Trp Asp Thr Asn Pro Thr Arg Ala Gln
 1045 1050 1055
 Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Val Lys Val Val Asn Ser Thr Thr Gly Pro

ES 2 559 235 T3

Gln Gly Val Leu Gln Asn Val Arg Phe Val Phe Gly Thr Thr Pro Glu
 210 215 220
 Asp Ile Leu Arg Asn Lys Gly Cys Ser Ser Ser Ala Thr Asn Val Leu
 225 230 235
 Leu Thr Leu Asp Asn Asn Val Val Asn Gly Ser Ser Pro Ala Ile Arg
 245 250 255
 Thr Asn Tyr Ile Gly His Lys Thr Lys Asp Leu Gln Ala Ile Cys Gly
 260 265
 Leu Ser Cys Asp Glu Leu Ser Ser Met Val Leu Glu Leu Lys Gly Leu
 275 280 285
 Arg Thr Ile Val Thr Thr Leu Gln Asp Ser Ile Arg Lys Val Thr Glu
 290 295 300
 Glu Asn Arg Glu Leu Val Ser Glu Leu Lys Arg Pro Pro Leu Cys Phe
 305 310 315 320
 His Asn Gly Val Gln Tyr Lys Asn Asn Glu Glu Trp Thr Val Asp Ser
 325 330 335
 Cys Thr Glu Cys His Cys Gln Asn Ser Val Thr Ile Cys Lys Lys Val
 340 345 350
 Ser Cys Pro Ile Met Pro Cys Ser Asn Ala Thr Val Pro Asp Gly Glu
 355 360 365
 Cys Cys Pro Arg Cys Trp Pro Ser Asp Ser Ala Asp Asp Gly Trp Ser
 370 375 380
 Pro Trp Ser Glu Trp Thr Ser Cys Ser Ala Thr Cys Gly Asn Gly Ile
 385 390 395 400
 Gln Gln Arg Gly Arg Ser Cys Asp Ser Leu Asn Asn Arg Cys Glu Gly
 405 410 415
 Ser Ser Val Gln Thr Arg Thr Cys His Ile Gln Glu Cys Asp Lys Arg
 420 425 430
 Phe Lys Gln Asp Gly Gly Trp Ser His Trp Ser Pro Trp Ser Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Thr Cys Gly Asp Gly Val Ile Thr Arg Ile Arg Leu Cys Asn
 450 455 460
 Ser Pro Ser Pro Gln Met Asn Gly Lys Pro Cys Glu Gly Glu Ala Arg
 465 470 475 480
 Glu Thr Lys Ala Cys Lys Lys Asp Ala Cys Pro Ile Asn Gly Gly Trp
 485 490 495
 Gly Pro Trp Ser Pro Trp Asp Ile Cys Ser Val Thr Cys Gly Gly Gly
 500 505 510
 Val Gln Arg Arg Ser Arg Leu Cys Asn Asn Pro Thr Pro Gln Phe Gly
 515 520 525
 Gly Lys Asp Cys Val Gly Asp Val Thr Glu Asn Gln Val Cys Asn Lys
 530 535 540
 Gln Asp Cys Pro Ile Asp Gly Cys Leu Ser Asn Pro Cys Phe Ala Gly
 545 550 555 560
 Ala Lys Cys Thr Ser Tyr Pro Asp Gly Ser Trp Lys Cys Gly Ala Cys

ES 2 559 235 T3

565					570					575					
Pro	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gly	Asn	Gly	Ile	Gln	Cys	Lys	Asp	Val	Asp	Glu
			580					585					590		
Cys	Lys	Glu	Val	Pro	Asp	Ala	Cys	Phe	Asn	His	Asn	Gly	Glu	His	Arg
		595					600					605			
Cys	Lys	Asn	Thr	Asp	Pro	Gly	Tyr	Asn	Cys	Leu	Pro	Cys	Pro	Pro	Arg
		610				615					620				
Phe	Thr	Gly	Ser	Gln	Pro	Phe	Gly	Arg	Gly	Val	Glu	His	Ala	Met	Ala
						630					635				640
Asn	Lys	Gln	Val	Cys	Lys	Pro	Arg	Asn	Pro	Cys	Thr	Asp	Gly	Thr	His
				645					650					655	
Asp	Cys	Asn	Lys	Asn	Ala	Lys	Cys	Asn	Tyr	Leu	Gly	His	Tyr	Ser	Asp
			660					665					670		
Pro	Met	Tyr	Arg	Cys	Glu	Cys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Ala	Gly	Asn	Gly	Ile
		675					680					685			
Ile	Cys	Gly	Glu	Asp	Thr	Asp	Leu	Asp	Gly	Trp	Pro	Asn	Glu	Asn	Leu
		690				695					700				
Val	Cys	Val	Ala	Asn	Ala	Thr	Tyr	His	Cys	Lys	Lys	Asp	Asn	Cys	Pro
						710					715				720
Asn	Leu	Pro	Asn	Ser	Gly	Gln	Glu	Asp	Tyr	Asp	Lys	Asp	Gly	Ile	Gly
				725					730					735	
Asp	Ala	Cys	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asn	Asp	Lys	Ile	Pro	Asp	Asp	Arg
			740					745					750		
Asp	Asn	Cys	Pro	Phe	His	Tyr	Asn	Pro	Ala	Gln	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Arg
		755					760					765			
Asp	Asp	Val	Gly	Asp	Arg	Cys	Asp	Asn	Cys	Pro	Tyr	Asn	His	Asn	Pro
		770				775					780				
Asp	Gln	Ala	Asp	Thr	Asp	Lys	Asn	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Cys	Ala	Val
				790							795				800
Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ile	Leu	Asn	Glu	Arg	Asp	Asn	Cys	Gln	Tyr
				805					810					815	
Val	Tyr	Asn	Val	Asp	Gln	Arg	Asp	Thr	Asp	Met	Asp	Gly	Val	Gly	Asp
			820					825					830		
Gln	Cys	Asp	Asn	Cys	Pro	Leu	Glu	His	Asn	Pro	Asp	Gln	Leu	Asp	Ser
		835					840					845			
Asp	Ser	Asp	Leu	Ile	Gly	Asp	Thr	Cys	Asp	Asn	Asn	Gln	Asp	Ile	Asp
		850				855						860			
Glu	Asp	Gly	His	Gln	Asn	Asn	Leu	Asp	Asn	Cys	Pro	Tyr	Val	Pro	Asn
											875				880
Ala	Asn	Gln	Ala	Asp	His	Asp	Lys	Asp	Gly	Lys	Gly	Asp	Ala	Cys	Asp
				885							890			895	
His	Asp	Asp	Asp	Asn	Asp	Gly	Ile	Pro	Asp	Asp	Arg	Asp	Asn	Cys	Arg
			900					905					910		
Leu	Val	Pro	Asn	Pro	Asp	Gln	Lys	Asp	Ser	Asp	Gly	Asp	Gly	Arg	Gly
		915					920					925			

ES 2 559 235 T3

Asp Ala Cys Lys Asp Asp Phe Asp His Asp Asn Val Pro Asp Ile Asp
 930 935 940
 Asp Ile Cys Pro Glu Asn Phe Asp Ile Ser Glu Thr Asp Phe Arg Gln
 945 950 955
 Phe Gln Met Ile Pro Leu Asp Pro Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Pro
 965 970 975
 Asn Trp Val Val Arg His Gln Gly Lys Glu Leu Val Gln Thr Val Asn
 980 985 990
 Cys Asp Pro Gly Leu Ala Val Gly Tyr Asp Glu Phe Asn Ala Val Asp
 995 1000 1005
 Phe Ser Gly Thr Phe Phe Ile Asn Thr Glu Arg Asp Asp Asp Tyr Ala
 1010 1015 1020
 Gly Phe Val Phe Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Arg Phe Tyr Val Val Met
 1025 1030 1035
 Trp Lys Gln Val Thr Gln Ser Tyr Trp Asp Thr Asn Pro Thr Arg Ala
 1045 1050 1055
 Gln Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Val Lys Val Val Asn Ser Thr Thr Gly
 1060 1065 1070
 Pro Gly Glu His Leu Arg Asn Ala Leu Trp His Thr Gly Asn Thr Pro
 1075 1080 1085
 Gly Gln Val Arg Thr Leu Trp His Asp Pro Arg His Ile Gly Trp Lys
 1090 1095 1100
 Asp Phe Thr Ala Tyr Arg Trp Arg Leu Ser His Arg Pro Lys Thr Gly
 1105 1110 1115 1120
 Tyr Ile Arg Val Val Met Tyr Glu Gly Lys Lys Ile Met Ala Asp Ser
 1125 1130 1135
 Gly Pro Ile Tyr Asp Lys Thr Tyr Ala Gly Gly Arg Leu Gly Leu Phe
 1140 1145 1150
 Val Phe Ser Gln Glu Met Val Phe Phe Ser Asp Met Lys Tyr Glu Cys
 1155 1160 1165
 Arg Asp Ser
 1170

<210> 5

5 <211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 5

Met Ser Leu Val Leu Leu Ser Leu Ala Ala Leu Cys Arg Ser Ala Val
 1 5 10 15
 Pro Arg Glu Pro Thr Val Gln Cys Gly Ser Glu Thr Gly Pro Ser Pro
 20 25 30
 Glu Trp Met Leu Gln His Asp Leu Ile Pro Gly Asp Leu Arg Asp Leu
 35 40 45
 Arg Val Glu Pro Val Thr Thr Ser Val Ala Thr Gly Asp Tyr Ser Ile
 50 55 60
 Leu Met Asn Val Ser Trp Val Leu Arg Ala Asp Ala Ser Ile Arg Leu

ES 2 559 235 T3

Tyr Ser Cys Val Arg Cys Asn Tyr Thr Glu Ala Phe Gln Ser Gln Thr
 100 105 110
 Arg Pro Ser Gly Gly Lys Trp Thr Phe Ser Tyr Val Gly Phe Pro Val
 115 120 125
 Glu Leu Ser Thr Leu Tyr Leu Ile Ser Ala His Asn Ile Pro Asn Ala
 130 135 140
 Asn Met Asn Glu Asp Ser Pro Ser Leu Ser Val Asn Phe Thr Ser Pro
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Asn His Val Met Lys Tyr Lys Lys Gln Cys Thr Glu Ala
 165 170 175
 Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asp Ile Thr Ala Cys Lys Lys Asn Glu Lys
 180 185 190
 Met Val Glu Val Asn Phe Thr Thr Asn Pro Leu Gly Asn Arg Tyr Thr
 195 200 205
 Ile Leu Ile Gln Arg Asp Thr Thr Leu Gly Phe Ser Arg Val Leu Glu
 210 215 220
 Asn Lys Leu Met Arg Thr Ser Val Ala Ile Pro Val Thr Glu Glu Ser
 225 230 235 240
 Glu Gly Ala Val Val Gln Leu Thr Pro Tyr Leu His Thr Cys Gly Asn
 245 250 255
 Asp Cys Ile Arg Arg Glu Gly Thr Val Val Leu Cys Ser Glu Thr Ser
 260 265 270
 Ala Pro Ile Pro Pro Asp Asp Asn Arg Arg Met Leu Gly Gly Trp Leu
 275 280 285
 Pro Leu Phe Leu Val Leu Leu Val Ala Val Trp Val Leu Ala Ala Gly
 290 295 300
 Ile Tyr Leu Thr Trp Arg Gln Gly Arg Ser Thr Lys Thr Ser Phe Pro
 305 310 315 320
 Ile Ser Thr Met Leu Leu Pro Leu Ile Lys Val Leu Val Val Tyr Pro
 325 330 335
 Ser Glu Ile Cys Phe His His Thr Val Cys Arg Phe Thr Asp Phe Leu
 340 345 350
 Gln Asn Tyr Cys Arg Ser Glu Val Ile Leu Glu Lys Trp Gln Lys Lys
 355 360 365
 Lys Ile Ala Glu Met Gly Pro Val Gln Trp Leu Thr Thr Gln Lys Gln
 370 375 380
 Ala Ala Asp Lys Val Val Phe Leu Leu Pro Ser Asp Val Pro Thr Leu
 385 390 395 400
 Cys Asp Ser Ala Cys Gly His Asn Glu Gly Ser Ala Arg Glu Asn Ser
 405 410 415
 Gln Asp Leu Phe Pro Leu Ala Phe Asn Leu Phe Cys Ser Asp Phe Ser
 420 425 430
 Ser Gln Thr His Leu His Lys Tyr Leu Val Val Tyr Leu Gly Gly Ala
 435 440 445
 Asp Leu Lys Gly Asp Tyr Asn Ala Leu Ser Val Cys Pro Gln Tyr His
 450 455 460
 Leu Met Lys Asp Ala Thr Ala Phe His Thr Glu Leu Leu Lys Ala Thr
 465 470 475 480
 Gln Ser Met Ser Val Lys Lys Arg Ser Gln Ala Cys His Asp Ser Cys
 485 490 495
 Ser Pro Leu

5 <210> 7

<211> 208

ES 2 559 235 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 7

Met Lys Leu Leu Pro Ser Val Val Leu Lys Leu Phe Leu Ala Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Leu Val Thr Gly Glu Ser Leu Glu Arg Leu Arg Arg Gly
 20 25 30
 Leu Ala Ala Gly Thr Ser Asn Pro Asp Pro Pro Thr Val Ser Thr Asp
 35 40 45
 Gln Leu Leu Pro Leu Gly Gly Gly Arg Asp Arg Lys Val Arg Asp Leu
 50 55 60
 Gln Glu Ala Asp Leu Asp Leu Leu Arg Val Thr Leu Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80
 Gln Ala Leu Ala Thr Pro Asn Lys Glu Glu His Gly Lys Arg Lys Lys
 85 90 95
 Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys Leu Arg Lys Tyr
 100 105 110
 Lys Asp Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys Tyr Val Lys Glu Leu Arg
 115 120 125
 Ala Pro Ser Cys Ile Cys His Pro Gly Tyr His Gly Glu Arg Cys His
 130 135 140
 Gly Leu Ser Leu Pro Val Glu Asn Arg Leu Tyr Thr Tyr Asp His Thr
 145 150 155 160
 Thr Ile Leu Ala Val Val Ala Val Val Leu Ser Ser Val Cys Leu Leu
 165 170 175
 Val Ile Val Gly Leu Leu Met Phe Arg Tyr His Arg Arg Gly Gly Tyr
 180 185 190
 Asp Val Glu Asn Glu Glu Lys Val Lys Leu Gly Met Thr Asn Ser His
 195 200 205

10 <210> 8

<211> 208

<212> PRT

15

<213> Mus musculus

<400> 8

20 Met Lys Leu Leu Pro Ser Val Met Leu Lys Leu Phe Leu Ala Ala Val
 1 5 10 15

ES 2 559 235 T3

Leu Ser Ala Leu Val Thr Gly Glu Ser Leu Glu Arg Leu Arg Arg Gly
 20 25 30
 Leu Ala Ala Ala Thr Ser Asn Pro Asp Pro Pro Thr Gly Ser Thr Asn
 35 40 45
 Gln Leu Leu Pro Thr Gly Gly Asp Arg Ala Gln Gly Val Gln Asp Leu
 50 55 60
 Glu Gly Thr Asp Leu Asn Leu Phe Lys Val Ala Phe Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80
 Gln Gly Leu Ala Thr Pro Ser Lys Glu Arg Asn Gly Lys Lys Lys Lys
 85 90 95
 Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys Leu Arg Lys Tyr
 100 105 110
 Lys Asp Tyr Cys Ile His Gly Glu Cys Arg Tyr Leu Gln Glu Phe Arg
 115 120 125
 Thr Pro Ser Cys Lys Cys Leu Pro Gly Tyr His Gly His Arg Cys His
 130 135 140
 Gly Leu Thr Leu Pro Val Glu Asn Pro Leu Tyr Thr Tyr Asp His Thr
 145 150 155 160
 Thr Val Leu Ala Val Val Ala Val Val Leu Ser Ser Val Cys Leu Leu
 165 170 175
 Val Ile Val Gly Leu Leu Met Phe Arg Tyr His Arg Arg Gly Gly Tyr
 180 185 190
 Asp Leu Glu Ser Glu Glu Lys Val Lys Leu Gly Val Ala Ser Ser His
 195 200 205

<210> 9

5 <211> 21

<212> RNA

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena de sentido de siRNA para mRNA de TSP-2

15

<220>

<221> misc_característica

<222> (20)

20

<223> n is dT.

<220>

25

<221> misc_característica

<222> (21)

<223> n is dT.

30

<400> 9

21 cauuuagguu ccaguuauan n

35

<210> 10

<211> 21

<212> RNA
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> siRNA antisense strand for TSP-2 mRNA
10 <220>
<221> misc_característica
<222> (20)
15 <223> n is dT.
<220>
20 <221> misc_característica
<222> (21)
<223> n is dT.
25 <400> 10
21 uauaacugga accuuaaugn n

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una capacidad de una célula madre para diferenciar una célula en un condrocito, comprendiendo el método:
- 5 cultivar una célula madre en un medio;
- medir una concentración de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en trombospondina 1 (TSP-1), TSP-2 y receptor de interleucina 17b (IL-17BR) a partir del cultivo; e
- 10 identificar una capacidad de la célula madre cultivada para diferenciarse en un condrocito, en base a la concentración medida.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la identificación comprende comparar la concentración medida de al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en TSP-1, TSP-2 e IL-17BR con una concentración obtenida a partir de una célula de referencia como testigo, que se ha identificado que tiene una capacidad de diferenciación condrogénica.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en el que la identificación comprende adicionalmente, cuando la concentración medida es mayor que la concentración obtenida a partir de la célula de referencia, determinar que la célula madre tiene una capacidad de diferenciación condrogénica elevada y, cuando la concentración medida es más pequeña o igual que la concentración obtenida a partir de la célula de referencia, determinar que la célula madre tiene una capacidad de diferenciación condrogénica baja.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que la identificación comprende, si una cantidad de expresión de TSP-2 es mayor que 72 pg/ml/1,0x10⁵ células cuando la célula madre es cultivada en monocapa en un medio de mantenimiento durante 1 día o si una cantidad de expresión de TSP-2 es mayor que 550 pg/ml/1,0x10⁵ células cuando la célula madre es cultivada en sedimento en un medio de mantenimiento, determinar que la célula madre tiene una capacidad de diferenciación condrogénica elevada.
- 25 30 5. El método de la reivindicación 2, en el que la célula de referencia se selecciona entre el grupo que consiste en una UCB-MSC, una célula madre mesenquimal de médula ósea (BM-MSC) y un fibroblasto.

FIG. 1

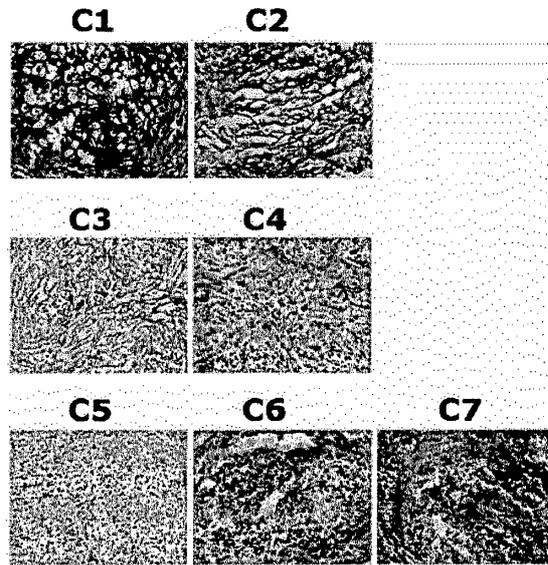


FIG. 2

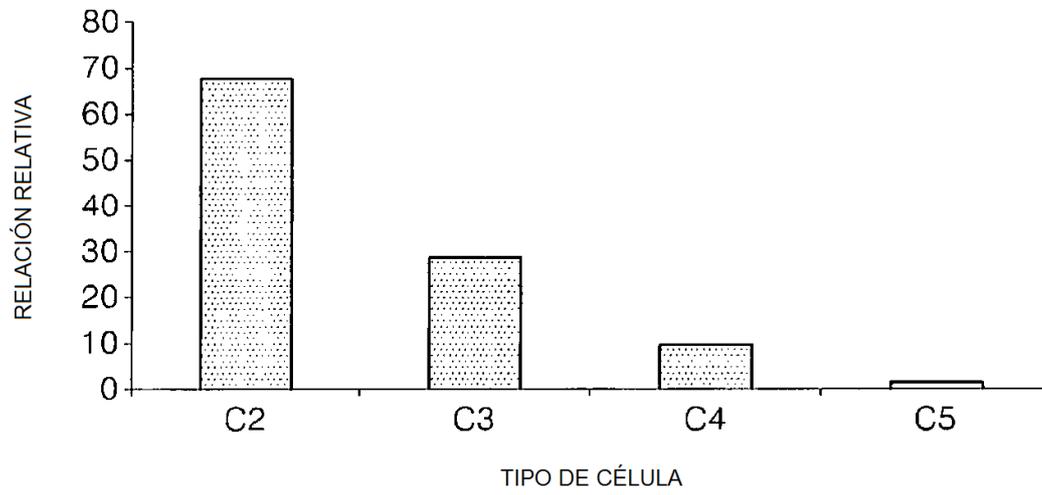


FIG. 3

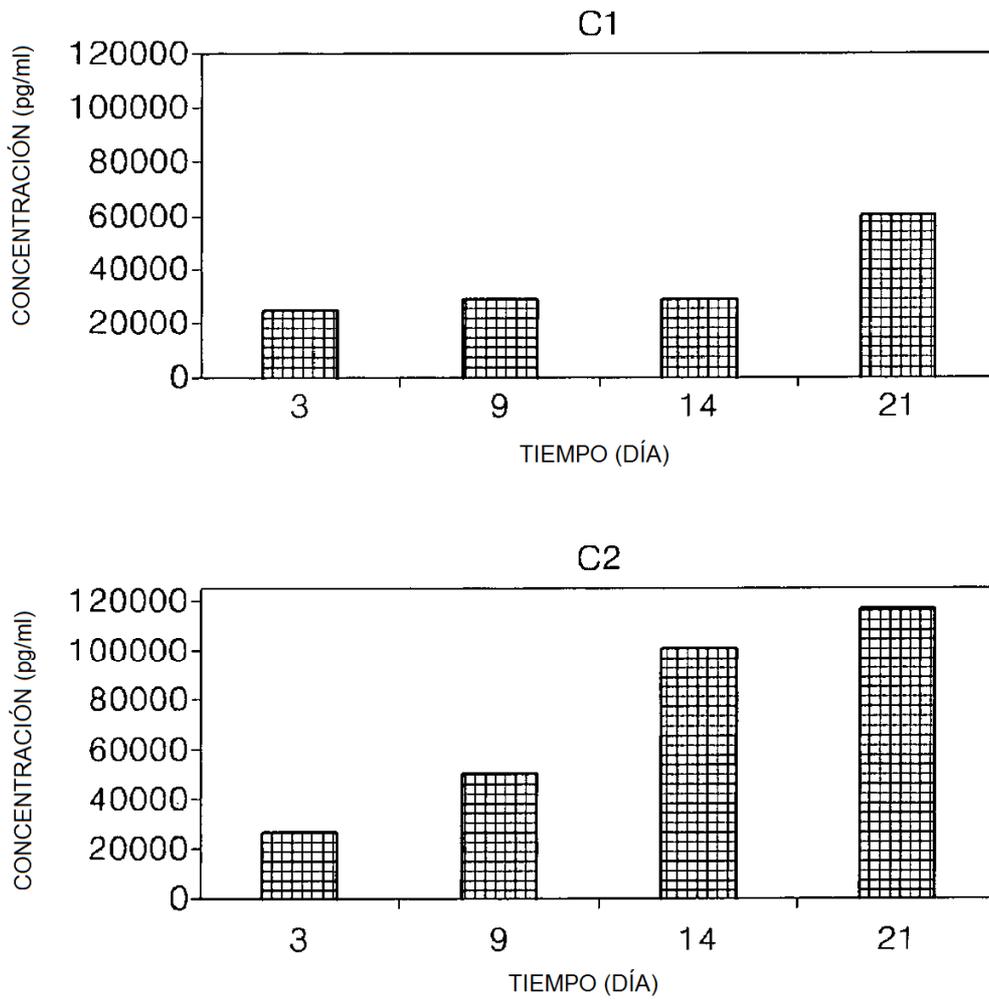


FIG. 4

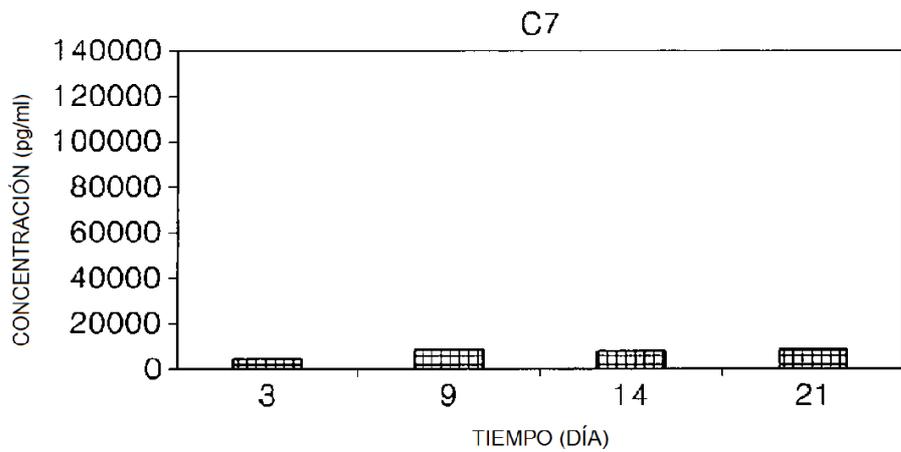
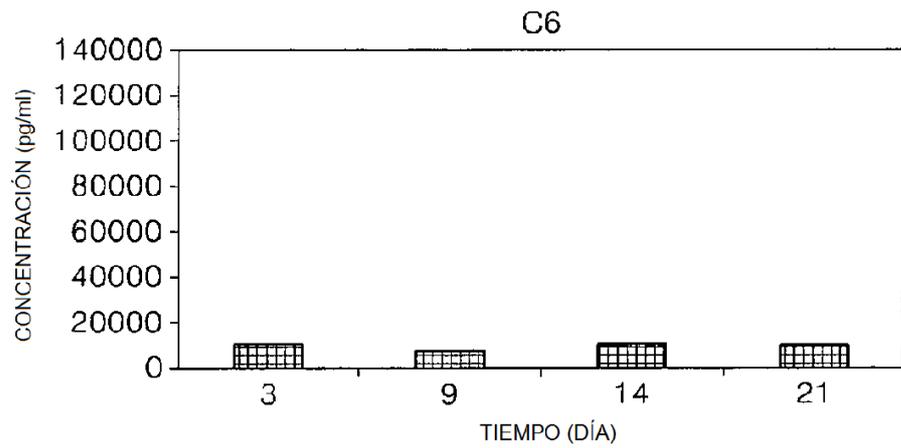
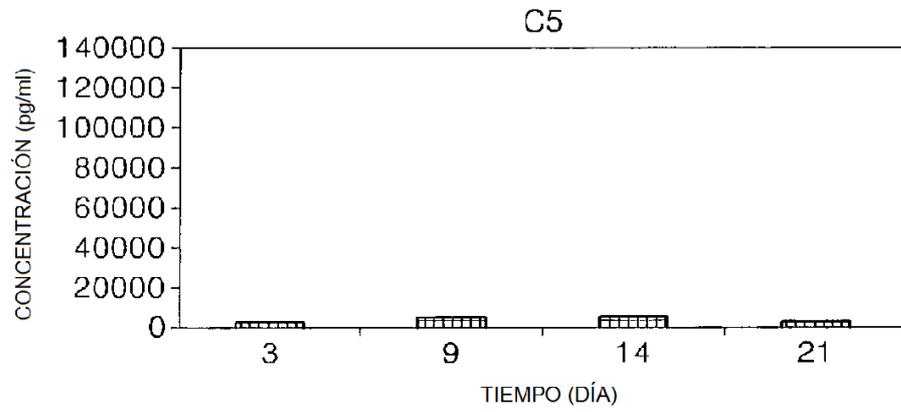


FIG. 5

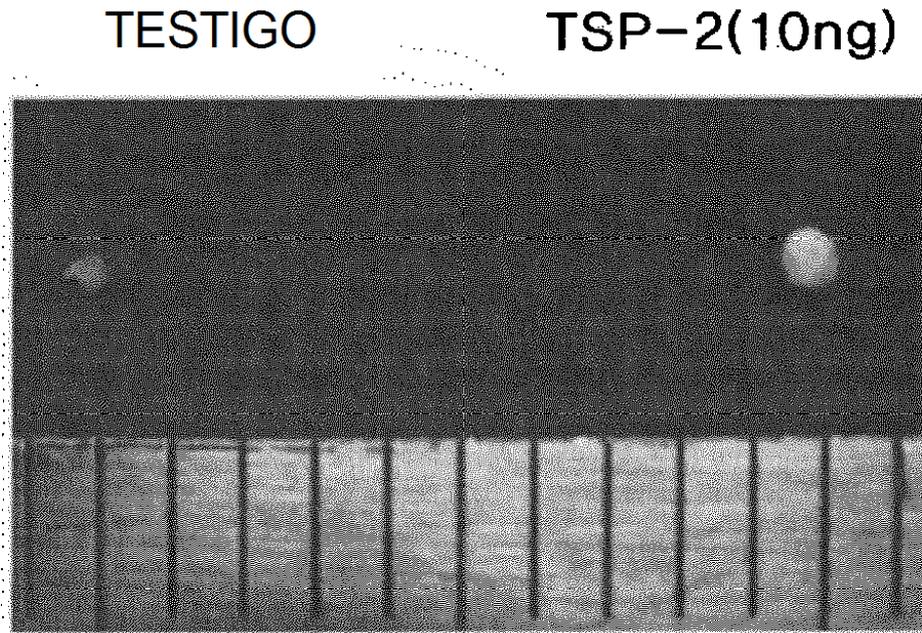


FIG. 6

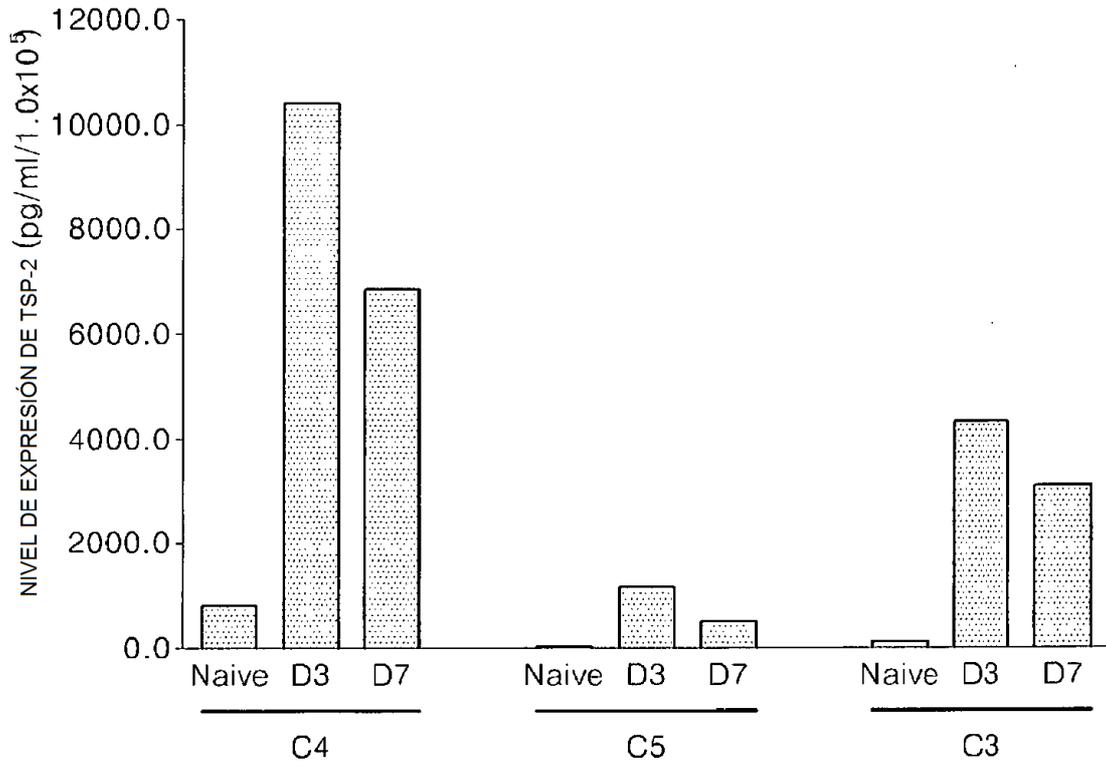


FIG. 7

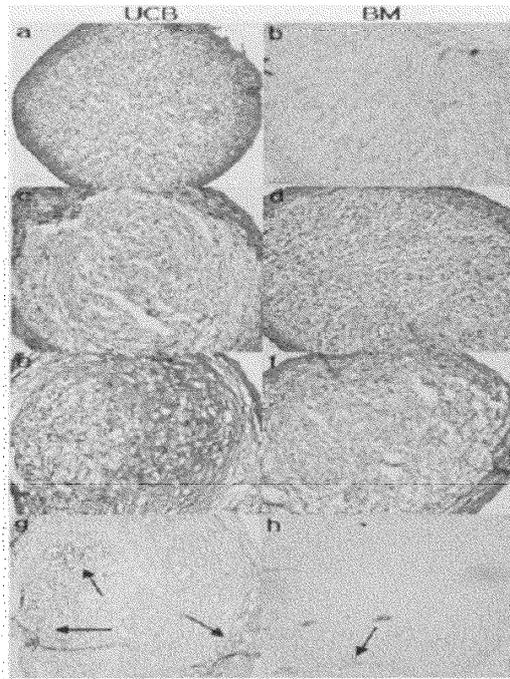


FIG. 8

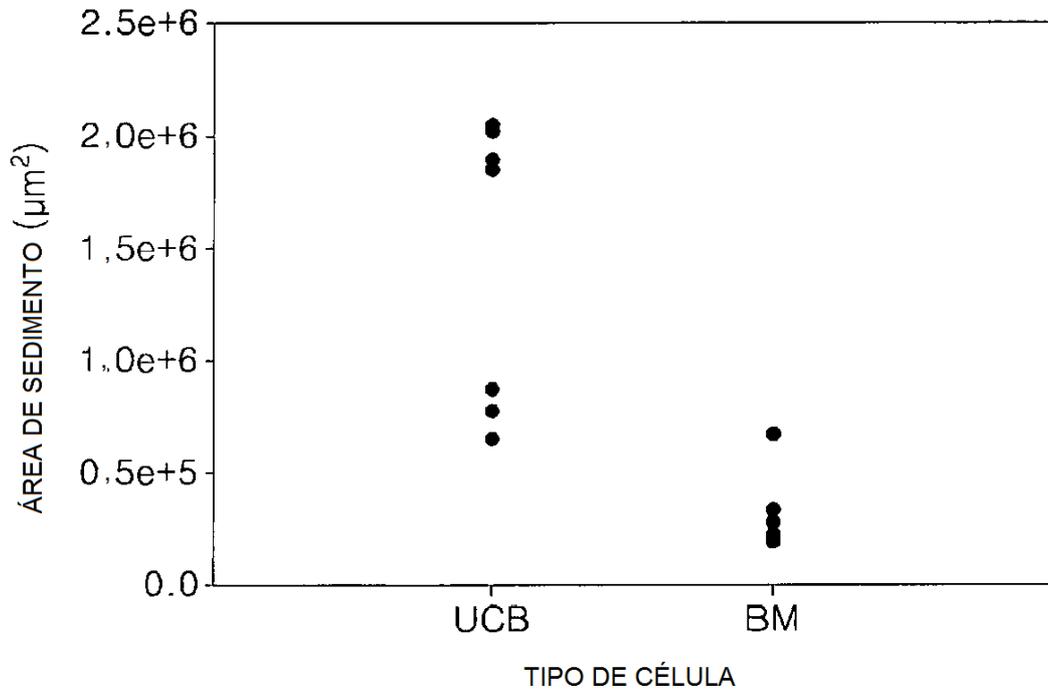


FIG. 9

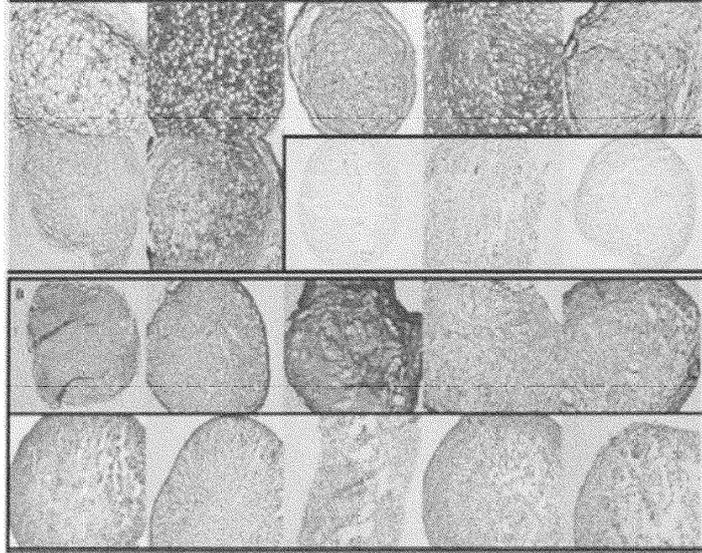


FIG. 10

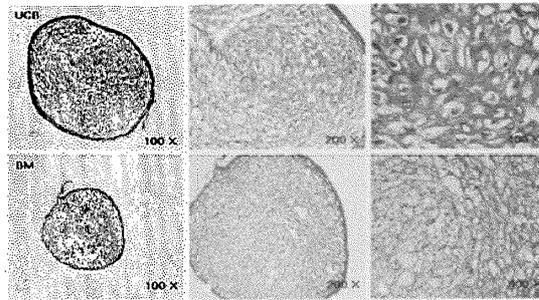


FIG. 11

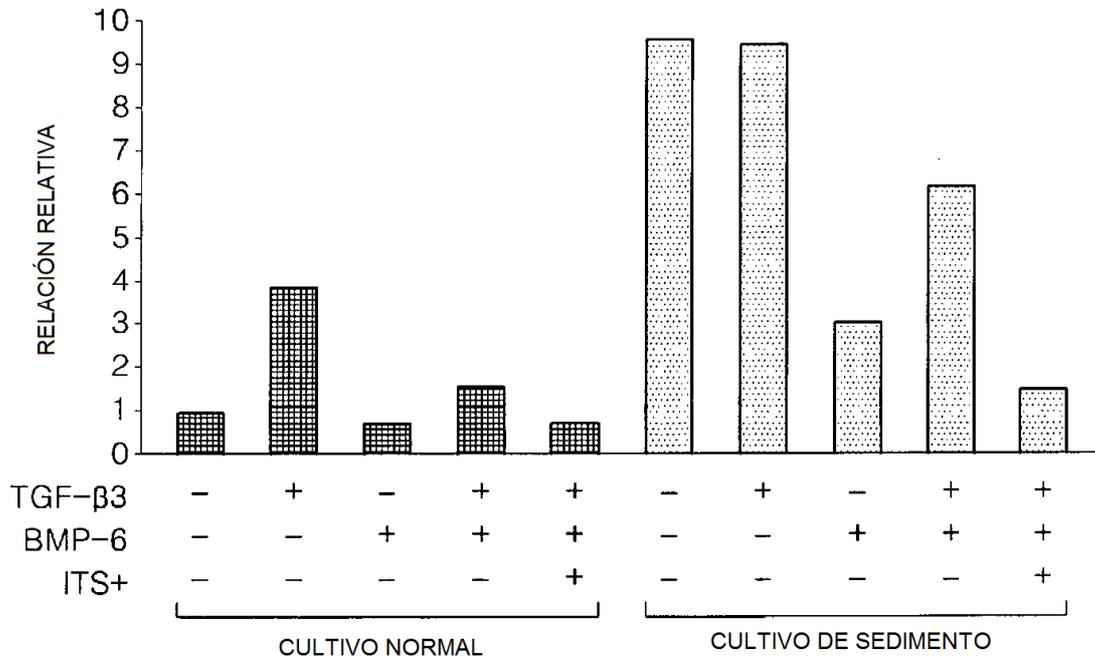


FIG. 12

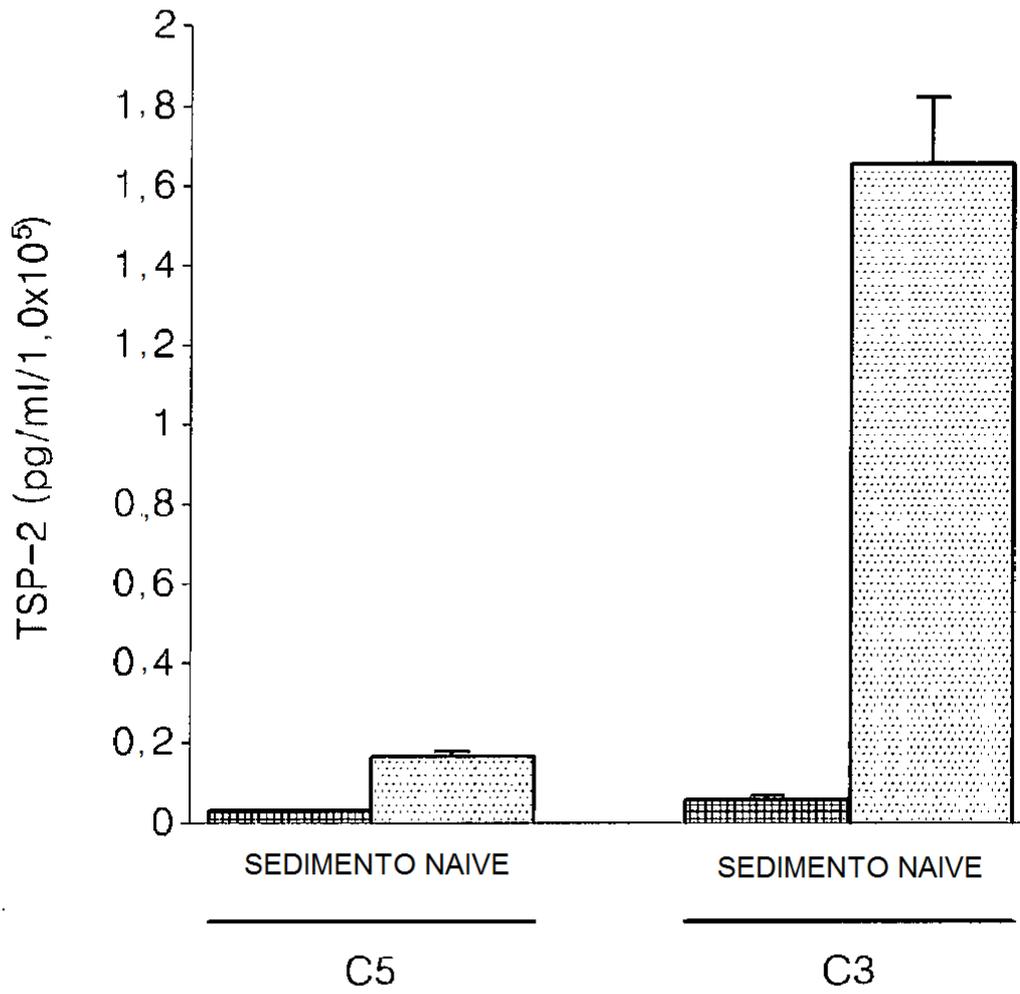


FIG. 13

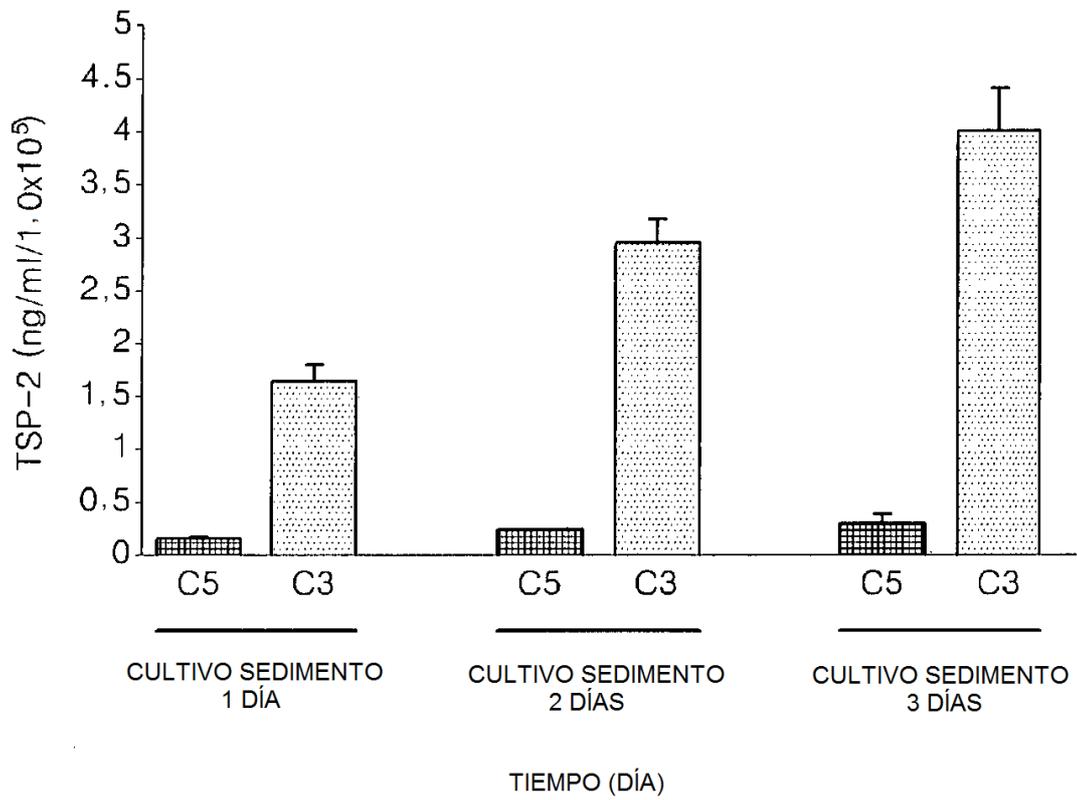


FIG. 14

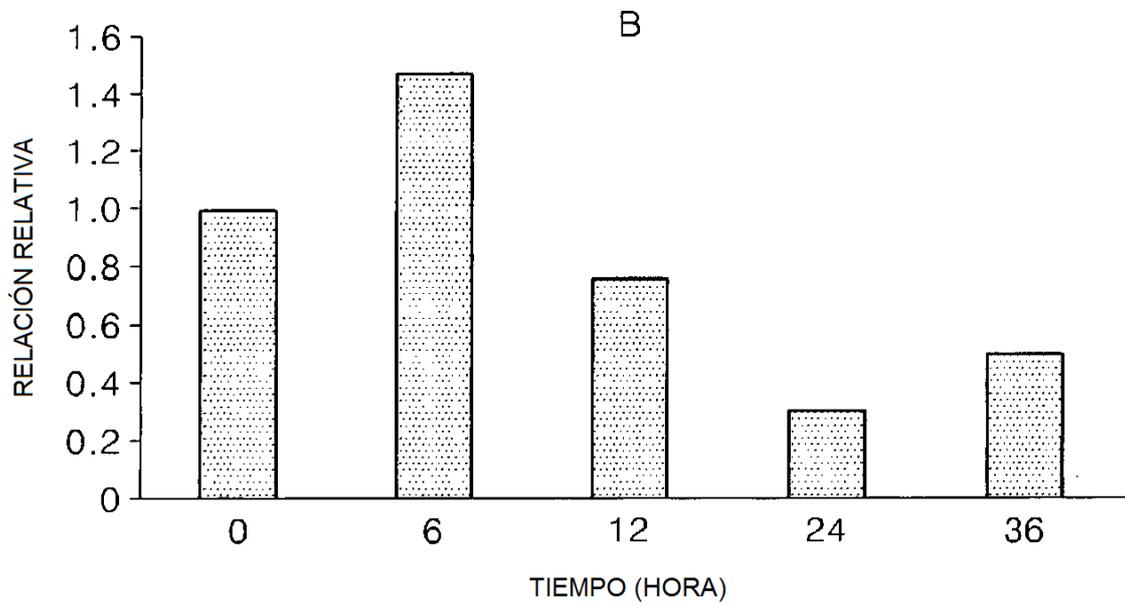
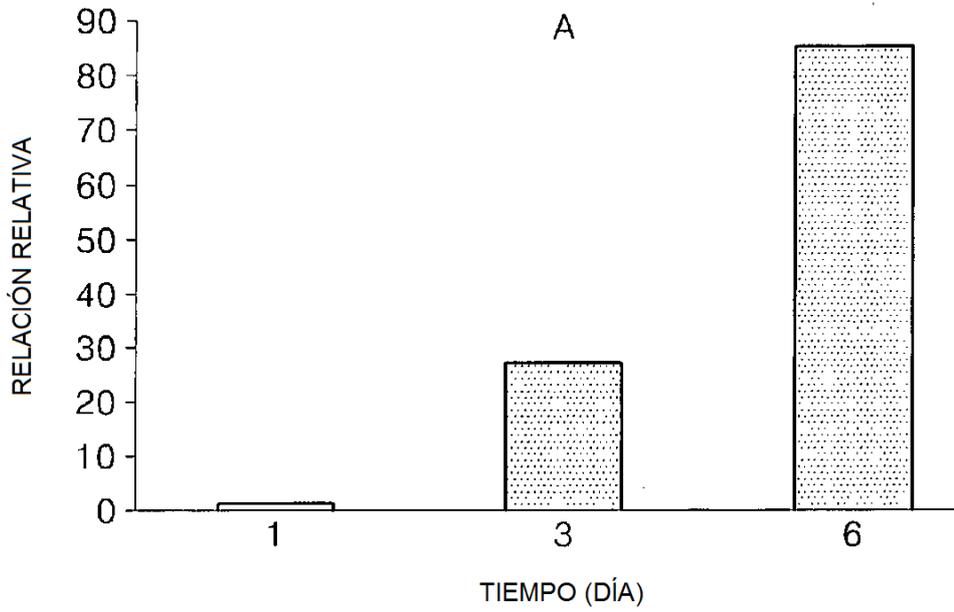


FIG. 15

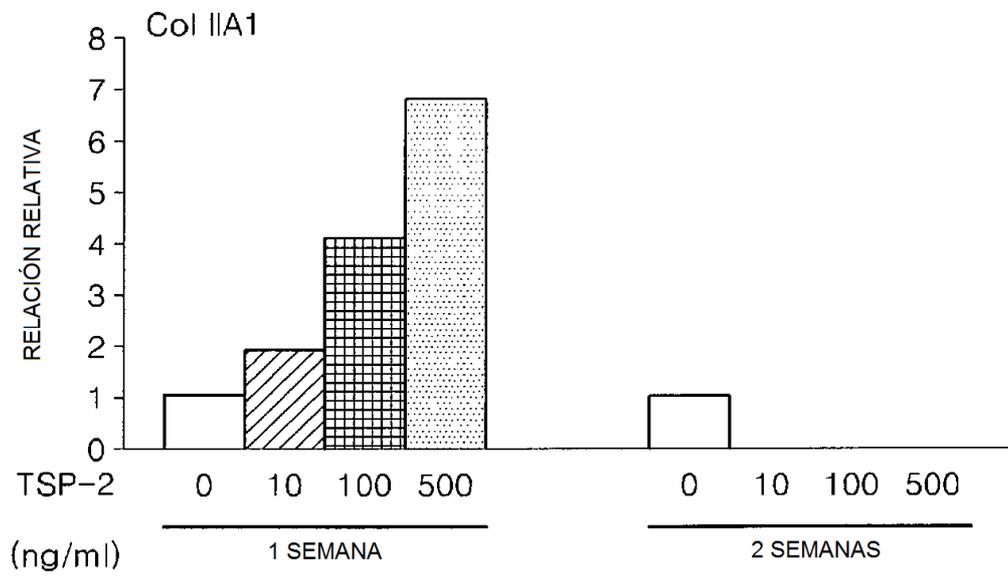
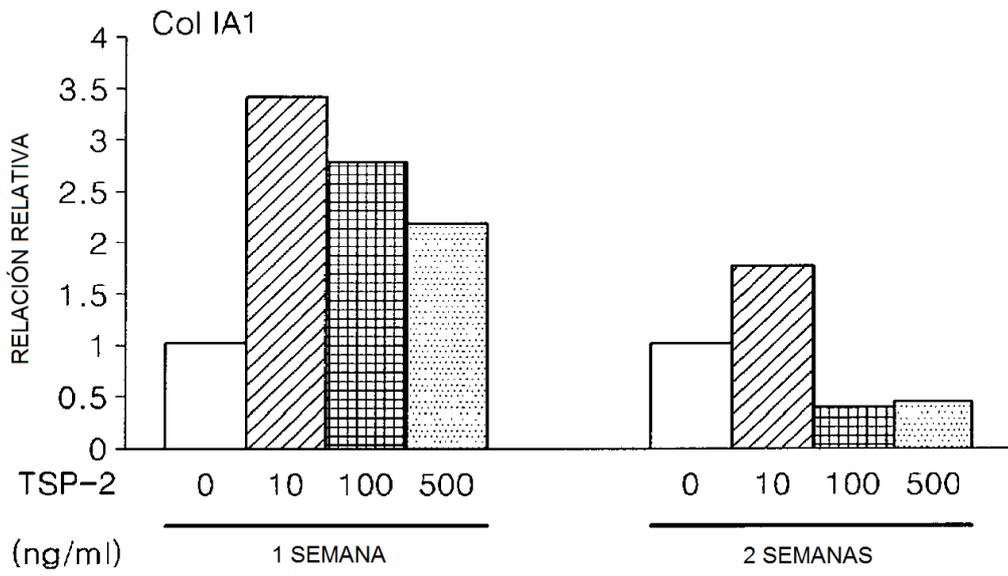


FIG. 16

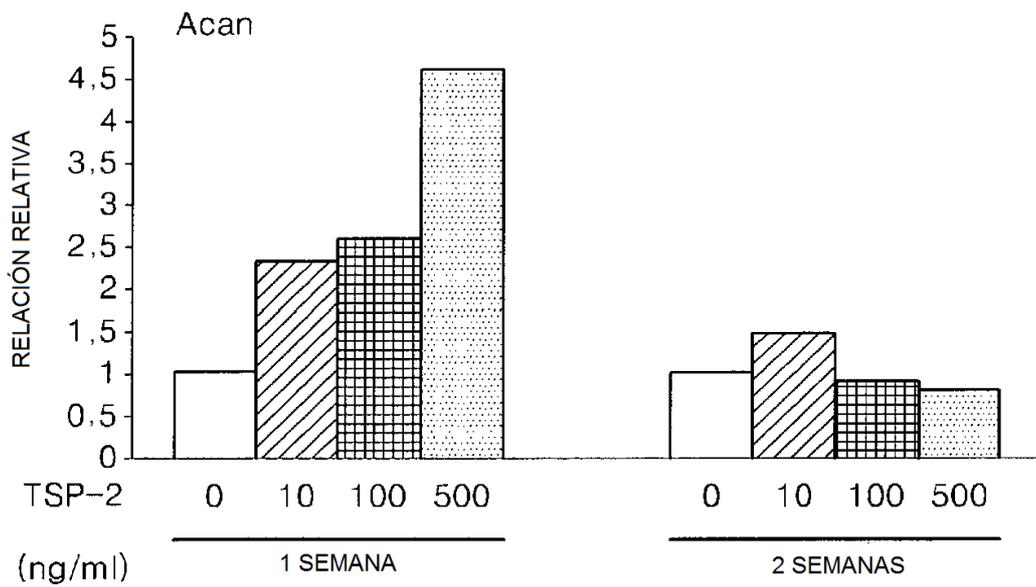
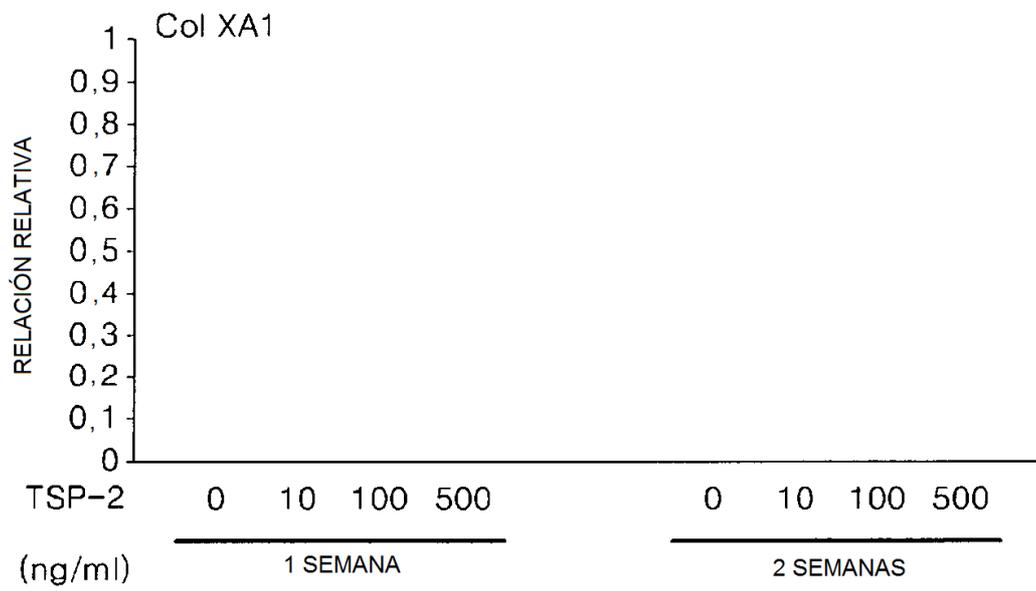


FIG. 17

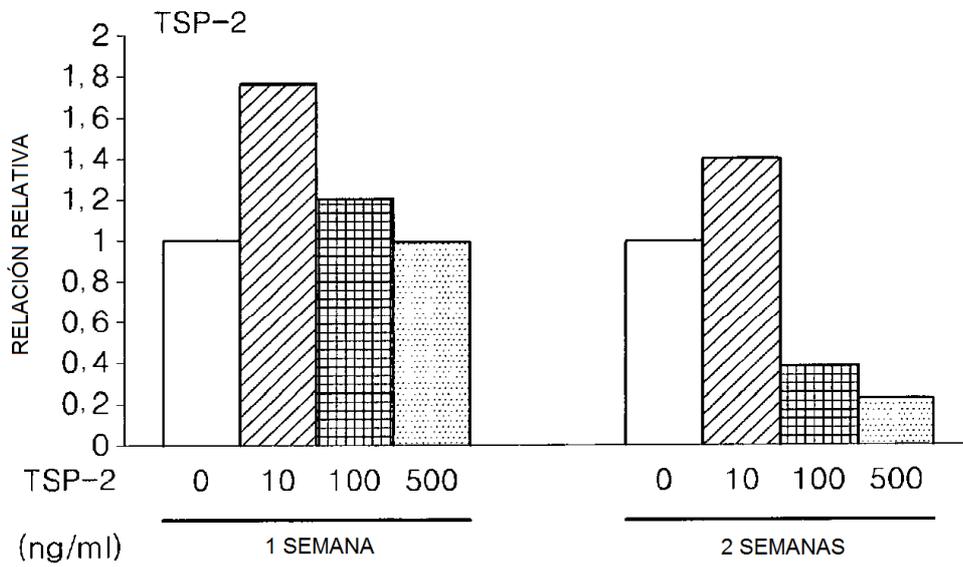
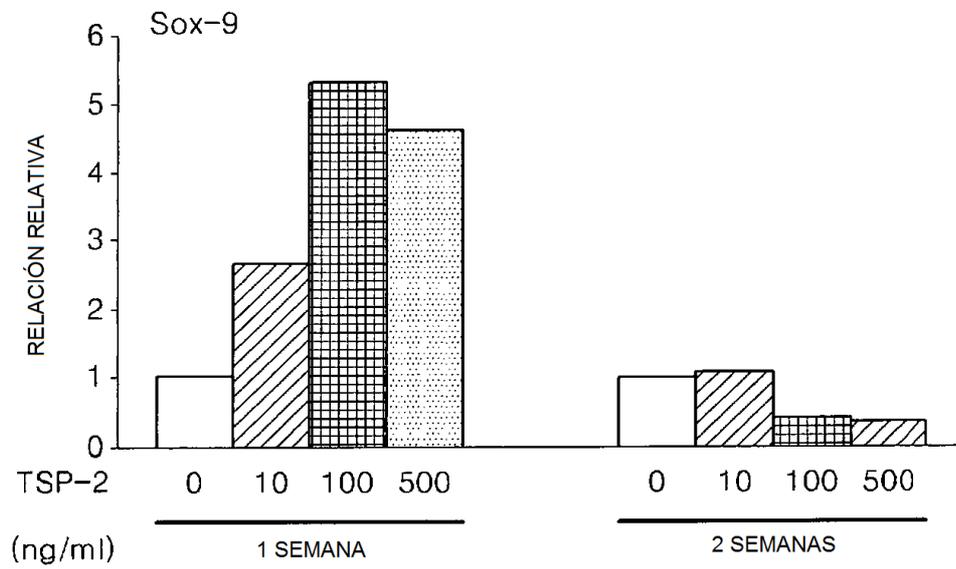


FIG. 18

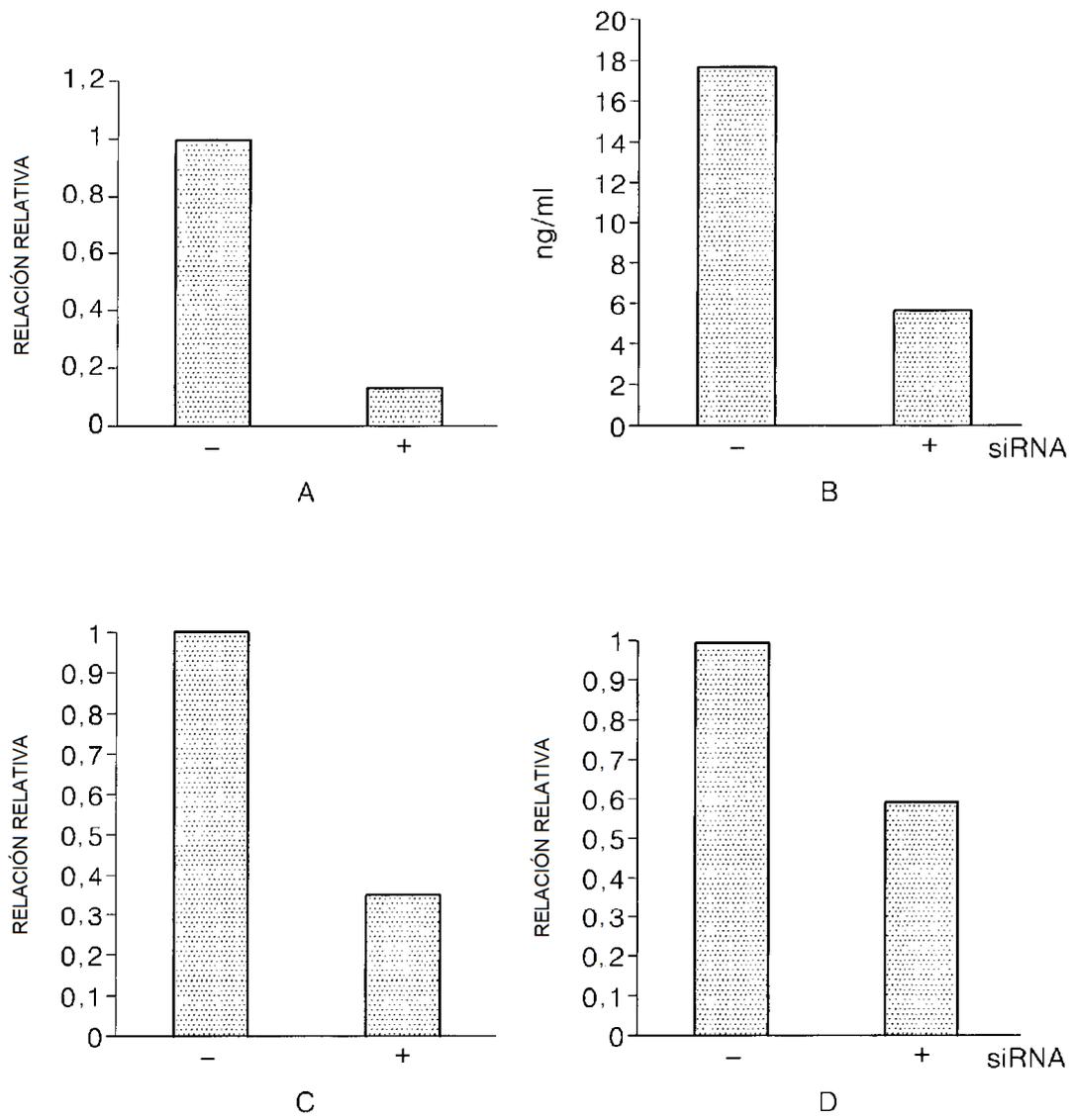


FIG. 19

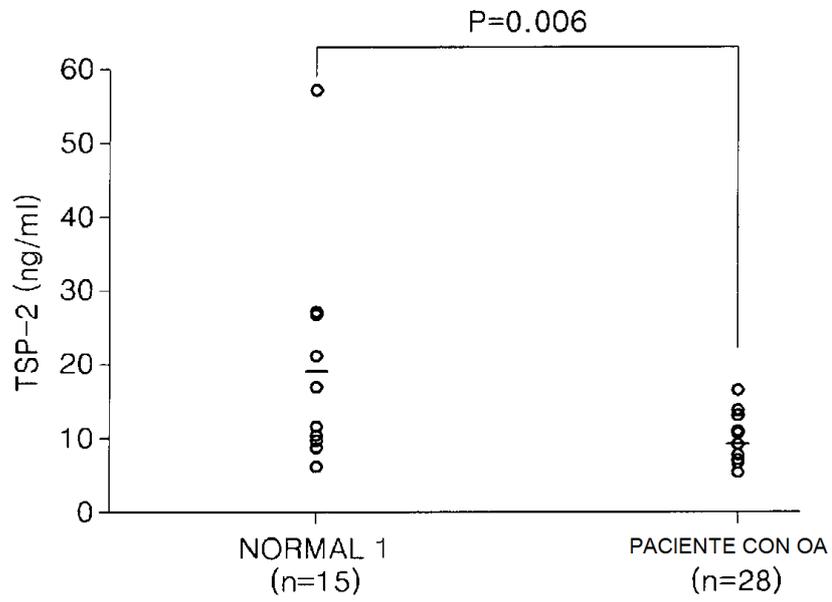


FIG. 20

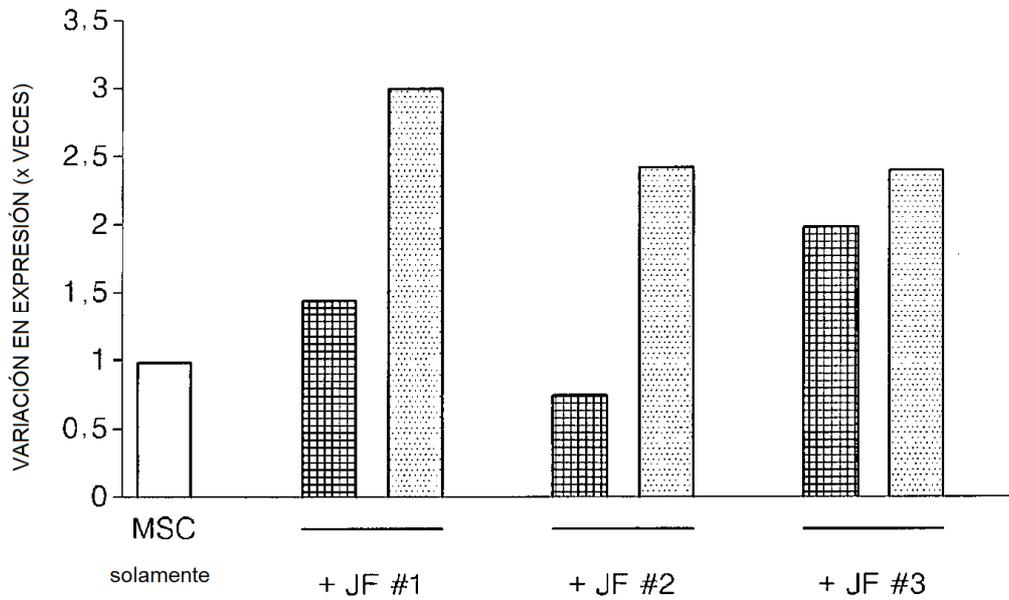


FIG. 21

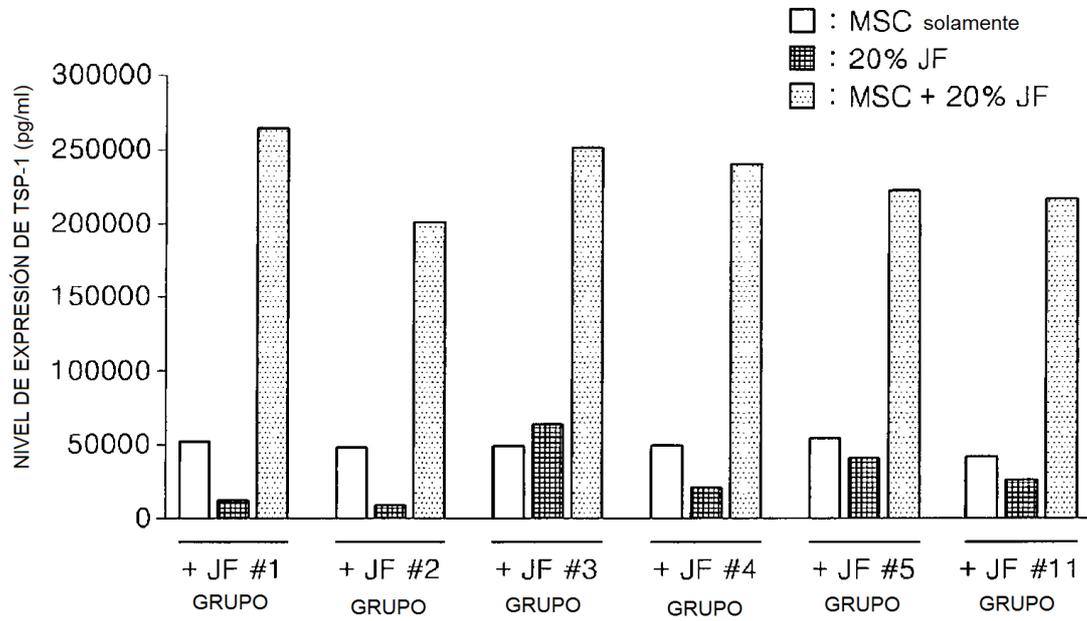


FIG. 22

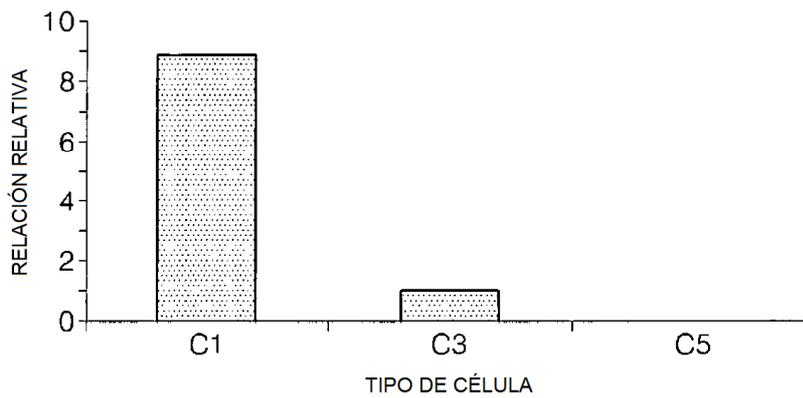


FIG. 23

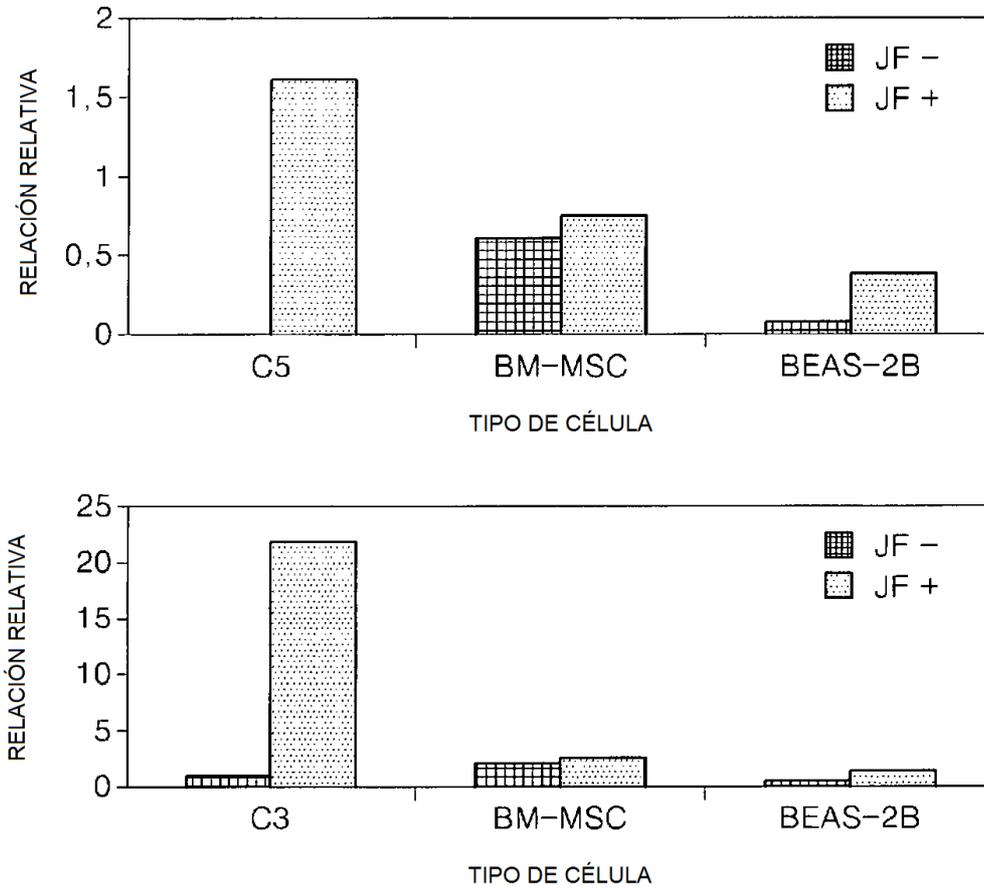


FIG. 24

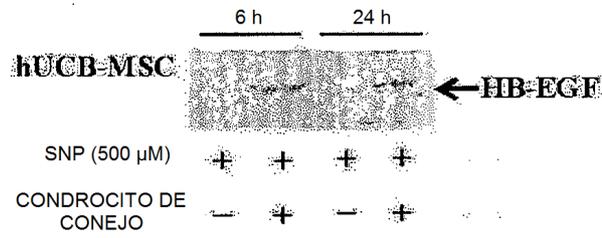


FIG. 25

	-SNP	+SNP (500μM)	+SNP (750μM)
CONDROCITO			
CONDROCITO (con HB-EGF: 50 ng/ml)			

FIG. 26

