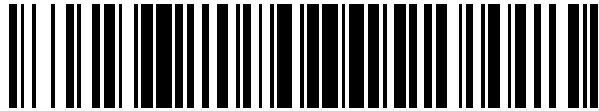


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 990**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2008 E 08704712 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2205724**

54 Título: **Método para el aislamiento y cultivo de células madre adultas derivadas del epitelio amniótico humano**

30 Prioridad:

09.11.2007 KR 20070114451

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

08.09.2016

73 Titular/es:

**RNL BIO CO., LTD. (100.0%)
1596-7 BONGCHEON-DONG, GWANAK-GU
SEOUL 151-050, KR**

72 Inventor/es:

**RA, JEONG CHAN;
SHIN, IL SEOB;
KANG, SUNG KEUN y
WOO, SANG KYU**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 581 990 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

Método para el aislamiento y cultivo de células madre adultas derivadas del epitelio amniótico humano

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un método para aislar y cultivar células madre adultas derivadas de la membrana amniótica humana con un alto rendimiento, y más particularmente a un método para obtener una gran cantidad de células madre adultas, comprendiendo el método obtener células epiteliales amnióticas provenientes de tejido amniótico humano, con un alto rendimiento, mediante tratamiento con ditiotreitól (DTT) y una baja concentración de tripsina, y cultivar las células epiteliales amnióticas en un medio que contiene un inhibidor de cinasa asociado a Rho.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 La biotecnología del siglo XXI presenta la posibilidad de nuevas soluciones a los problemas de alimentación, problemas ambientales y de salud, con el objetivo final de promover la prosperidad humana. En años recientes, la tecnología de utilizar células madre ha sido considerada como una nueva manera para tratar enfermedades incurables. Previamente, el trasplante de órganos, la terapia génica, etc., fueron presentadas para el tratamiento de enfermedades humanas incurables, pero su uso eficiente no ha sido logrado debido al rechazo inmunitario, al suministro corto de órganos, al desarrollo insuficiente de vectores, y a un conocimiento insuficiente de los genes de enfermedad.

15 Por esta razón, con el interés cada vez mayor en los estudios de células madre, se ha reconocido que las células madre totipotentes que tienen la habilidad para formar todos los órganos mediante proliferación y diferenciación pueden no solamente tratar a la mayoría de las enfermedades, sino también sanar fundamentalmente los daños a órganos. También, muchos científicos han sugerido la posibilidad de aplicación clínica de las células madre para la regeneración de todos los órganos y el tratamiento de las enfermedades incurables, incluyendo la enfermedad de Parkinson, diversos cánceres, diabetes y daños a la médula espinal.

20 Las células madre se refieren a células que tienen no solamente la habilidad para autorreplicarse, sino también la habilidad para diferenciarse en al menos dos células y pueden ser divididas en células madre totipotentes, células madre pluripotentes, y células madre multipotentes.

25 Las células madre totipotentes son células con propiedades totipotentes capaces de desarrollarse en un individuo perfecto, y estas propiedades son poseídas por células hasta la etapa de 8 células después de la fertilización de un oocito y un espermatozoide. Cuando estas células son aisladas y trasplantadas dentro del útero, éstas pueden desarrollarse en un individuo perfecto.

30 Las células madre pluripotentes, las cuales son células capaces de desarrollarse en varias células y tejidos derivadas de las capas ectodérmica, mesodérmica y endodérmica, son derivadas de una masa celular interna, localizada dentro de los blastocitos generados 4-5 días después de la fertilización. Estas células son llamadas "células madre embrionarias" y pueden diferenciarse en otras diversas células tisulares, pero no formar nuevos organismos vivientes.

35 Las células madre multipotentes, que son células madre capaces de diferenciarse únicamente en células específicas para tejidos y órganos que contienen estas células, están involucradas no solamente en el crecimiento y desarrollo de diversos tejidos y órganos en los periodos fetal, neonatal y adulto, sino también en el mantenimiento de la homeostasis del tejido adulto y la función de la inducción de regeneración después del daño tisular. Las células multipotentes específicas de tejido son colectivamente llamadas "células madre adultas".

40 Las células madre adultas son obtenidas al tomar las células de diversos órganos humanos y desarrollando las células en células madre, y están caracterizadas por que éstas se diferencian únicamente en tejidos específicos. Sin embargo, recientemente los experimentos para diferenciar las células madre adultas en varios tejidos, incluyendo células del hígado, tuvieron éxito y de este modo están recibiendo atención.

45 Las células madre multipotentes fueron primeramente aisladas de médula ósea de adulto (Jiang et al., Nature, 418:41, 2002), y son también encontradas en otros diversos tejidos de adulto (Verfaillie, Trends Cell Biol., 12:502, 2002). En otras palabras, aunque la médula ósea sea la fuente más ampliamente conocida de células madre, las células madre multipotentes fueron también encontradas en la piel, los vasos sanguíneos, los músculos y el cerebro (Tomas et al., Nat. Cell Biol., 3:778, 2001; Sampaolesi et al., Science, 301:487, 2003; Jiang et al., Exp. Hematol., 30:896, 2002). Sin embargo, las células madre están muy raramente presentes en tejidos de adulto, tales como la médula ósea, y tales células son difíciles de cultivar sin inducir diferenciación, y de este modo difíciles de cultivar en ausencia de medios específicamente seleccionados. A saber, es muy difícil mantener las células madre aisladas *in vitro*.

55 Mientras tanto, los resultados de los estudios sobre el aislamiento de las células madre mesenquimatosas provenientes de tejido fetal revelaron que existen abundantes células madre mesenquimatosas en el tejido fetal. Sin embargo, el uso del tejido fetal como una fuente de agentes terapéuticos celulares ha estado limitado debido a

problemas éticos. Las células madre mesenquimatosas fueron también aisladas de sangre de cordón umbilical (UCB) como la fuente de células madre mesenquimatosas fetales (MSCs), pero sus números fueron muy pequeños, y muestran una proliferación pobre.

5 Por otra parte, en el caso de las células madre placentarias las cuales están recibiendo un gran cúmulo de atención recientemente debido al excelente potencial de diferenciación y seguridad, las células madre mesenquimatosas pueden ser extraídas en una cantidad 100 veces mayor que aquellas provenientes de sangre de cordón umbilical. Además, la sangre de cordón umbilical puede ser utilizada solamente una vez y la sangre de cordón umbilical donadora, es adicionalmente necesaria después de la edad de 15 años, mientras que las células madre placentarias pueden ser utilizadas varias veces, y de este modo pueden ser también utilizadas en adultos. Además, las células madre placentarias pueden ser utilizadas para una más amplia gama de enfermedades. Las células madre hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical son principalmente utilizadas para enfermedades sanguíneas, mientras que las células madre placentarias pueden ser ventajosamente utilizadas para tratar daño celular y pueden ser utilizadas en el futuro para tratar muchas enfermedades, incluyendo insuficiencia cardíaca, apoplejía, diabetes, osteoporosis, artritis degenerativa, y similares.

15 Sin embargo, en el caso de utilizar la placenta como la fuente de células madre adultas, es difícil utilizar el tejido placentario recolectado inmediatamente después del parto, siempre que sea necesario, y de hecho, para la aplicación industrial (inyección de placenta, productos cosméticos de placenta, etc.) del tejido placentario, el tejido placentario recolectado después del parto es almacenado en frío para el uso. Las células madre derivadas de la placenta presentes en un estado no diferenciado pueden ser obtenidas en una cantidad grande únicamente a partir de la placenta recolectada inmediatamente después del parto, y es muy difícil de obtener una gran cantidad de células madre adultas del tejido placentario varios horas después del parto, o particularmente del tejido placentario que ha sido almacenado en frío por un periodo prolongado de tiempo.

25 Por esta razón, con el fin de utilizar las células madre adultas derivadas de placenta en aplicaciones industriales existe una necesidad urgente para desarrollar tecnologías para preparar una gran cantidad de células madre adultas a partir del tejido placentario almacenado en frío, o similares. Entre las células madre adultas, se sabe que las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas poseen propiedades más similares a las propiedades de las células madre embrionarias, y de este modo tienen la capacidad de diferenciarse en varias células, mientras que éstas son clínicamente seguras, debido a que éstas no provocan cáncer después del trasplante *in vivo*, de manera contraria a las células madre embrionarias (Miki et al., Stem Cell, 23:1549, 2005). Las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas es más probable que procedan hacia la apoptosis durante el cultivo y el subcultivo de células simples, de manera contraria a las células madre adultas derivadas de otros tejidos placentarios.

30 Por esta razón es difícil de inducir la proliferación de las células madre adultas no diferenciadas, derivadas de las células epiteliales amnióticas en números grandes, utilizando los métodos de cultivo convencionales (<http://www.cellapplications.com/HumanCells/HPIEpC.htm>).

El documento WO 2007/079183 describe células madre de la placenta y poblaciones de células madre placentarias, y métodos para obtener dichas células madre.

40 El documento WO 2007/047468 describe un método para suprimir una respuesta inmune, que comprende poner en contacto una pluralidad de células inmune con una pluralidad de células madre placentarias durante un tiempo suficiente para que dicha célula madre placentaria suprima de forma detectable una respuesta inmune, en el que dichas células madre placentarias suprimen de forma detectable la proliferación de células T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos.

45 El documento US 2007/0243172 describe un método para producir células madre placentarias, que comprende cultivar tejido amniótico, coriónico, decidual o placentario finamente cortado en un medio que contiene colagenasa y bFGF y recoger las células cultivadas.

50 VAN DER HEIJDEN P J ET AL: "Improved procedure for the isolation of functionally active lymphoid cells from the murine intestine", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL LNKD-DOI:10.1016/0022-1759(87) 90285-7, vol. 103, no. 2, 5 de noviembre 1987 (1987-11-05), páginas 161-167, XP023992484, describen un procedimiento de aislamiento para células linfoides de la lámina propia funcionalmente activas procedentes del intestino murino. El procedimiento implica la incubación con EDTA ditiotreitól de tejido intestinal para eliminar células epiteliales e intraepiteliales, seguido de la digestión con colagenasa de la membrana basal para liberar parte de la LPL.

55 En consecuencia, los presentes inventores han realizado muchos esfuerzos para preparar una gran cantidad de células madre adultas no diferenciadas, derivadas de células epiteliales amnióticas para aplicaciones prácticas de las mismas y, como resultado, han encontrado que una gran cantidad de células madre derivadas de las células epiteliales amnióticas pueden ser obtenidas del tejido placentario almacenado en frío, mediante el uso de DTT y un inhibidor de ROCK para aislar y cultivar células epiteliales amnióticas y cambiar la composición del medio de cultivo, con lo cual se completa la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para aislar células epiteliales amnióticas del tejido amniótico humano, con alto rendimiento, y un método para preparar células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas, aisladas.

- 5 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas humanas y un agente terapéutico celular para el sanado de heridas, que contienen las células madre adultas como un ingrediente activo.

10 Para lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona un método para aislar las células epiteliales amnióticas, que comprenden las etapas de: tratar el tejido amniótico humano de la placenta recolectado inmediatamente después del parto con ditiotreitól (DTT) 5-50 mM; tratar el tejido amniótico humano tratado con DTT con 0,025-0,125% de tripsina, y aislar las células epiteliales amnióticas del tejido amniótico.

15 La presente invención también proporciona un método para preparar células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas humanas, comprendiendo el método las etapas de: cultivar las células epiteliales amnióticas humanas aisladas de acuerdo al método, en un medio que contiene un inhibidor de cinasa asociado a Rho (ROCK); y recolectar las células madre del caldo de cultivo.

La presente invención también proporciona un método para proliferar y mantener las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas humanas, comprendiendo el método subcultivar las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas humanas, preparadas de acuerdo al método, en un medio que contiene un inhibidor de cinasa asociado a Rho (ROCK).

- 20 Se describen además células madre adultas derivadas de tejido epitelial amniótico humano, preparadas mediante dicho método, y un agente terapéutico para el sanado de heridas, el cual contiene las células madre adultas como un ingrediente activo.

Otras características y realizaciones de la presente invención serán más manifiestas a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones anexas.

25 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una comparación entre los rendimientos de las células epiteliales amnióticas después del tratamiento con o sin ditiotreitól (DTT) [A: células epiteliales amnióticas obtenidas mediante tratamiento con DTT y tripsina; B: células simples obtenidas mediante tratamiento con tripsina sola; C: células madre adultas obtenidas mediante cultivo de "A" y "D": células madre adultas obtenidas mediante cultivo de "B"].

- 30 La Figura 2 son fotografías que muestran la habilidad mejorada de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas, cultivadas en presencia de un inhibidor de ROCK.

La Figura 3 son fotografías que muestran una comparación de la habilidad mejorada de las células madre adulta para proliferar, 1 día después del tratamiento con el inhibidor de ROCK a diversas concentraciones.

- 35 La Figura 4 son fotografías que muestran una comparación de la habilidad mejorada de las células madre adultas para proliferar, 4 días después del tratamiento con el inhibidor de ROCK a diversas concentraciones.

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos al comparar la habilidad de las células madre para proliferar cuando son cultivadas con/sin el inhibidor de ROCK.

- 40 La Figura 6 son fotografías que muestran los resultados obtenidos al comparar la habilidad de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas para proliferar de acuerdo al periodo de tratamiento con el inhibidor de ROCK (control: células cultivadas durante 1 día sin tratamiento con el inhibidor de ROCK; A: células tratadas con el inhibidor de ROCK únicamente antes de la re-siembra y cultivadas durante 1 día, y B: células tratadas con el inhibidor de ROCK incluso después de la re-siembra y cultivados durante 1 día.

- 45 La Figura 7 muestra los resultados obtenidos al comparar la habilidad de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas para proliferar al cultivarlas en cada uno del medio DMEM y del medio K-SFM durante 3 días, 6 días y 8 días, respectivamente.

La Figura 8 muestra una comparación de la habilidad mejorada de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas para proliferar por el reemplazo del medio DMEM y del medio K-SFM.

Las Figuras 9 y 10 muestran los resultados del análisis citométrico de flujo de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas.

- 50 La Figura 11 son fotografías que muestran las respuestas de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas a SSEA4, Oct-4, citoqueratina y E-cadherina.

La Figura 12 son fotografías de microscopio óptico que muestran las características morfológicas de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas.

La Figura 13 son fotografías que muestran la adipogénesis, la osteogénesis y la miogénesis de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas.

5 La Figura 14 es una fotografía que muestra la neurogénesis de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas.

La Figura 15 es un diagrama gráfico que muestra los resultados obtenidos mediante observación de las velocidades de cierre de heridas en un modelo de herida animal.

10 La Figura 16 son fotografías de tinción con HyE de tejido cutáneo de herida recuperada en un grupo administrado con las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION, Y REALIZACIONES PREFERIDAS

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para aislar y preparar células epiteliales amnióticas con alto rendimiento, comprendiendo el método las etapas de: tratar el tejido amniótico humano de la placenta cosechado inmediatamente después del parto con ditiotreitól (DTT) 5-50 mM; tratar el tejido amniótico humano tratado con DTT, con 0,025-0,125% de tripsina, y aislar las células epiteliales amnióticas del tejido amniótico. La presente invención está caracterizada por que, en vez de extraer diversos tipos de células del tejido amniótico aislado de la placenta, únicamente las células epiteliales amnióticas son extraídas y aisladas del tejido amniótico. Las células epiteliales amnióticas se desarrollan a partir del epiblasto a los 8 días después de la fertilización y antes de la gastrulación, y éstas mantienen la plasticidad de las células embrionarias pre-gastrulación.

20 De este modo, se encontró que las células epiteliales amnióticas expresan los mismos marcadores superficiales que aquellos sobre las células madre embrionarias. Los resultados de los análisis inmunohistoquímico y genético revelaron que las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas tienen la habilidad de diferenciarse en células derivadas del endodermo, derivadas del mesodermo y derivadas del ectodermo, y no provocan formación de tumores *in vivo* (Miki et al., Stem Cell, 23:1549, 2005).

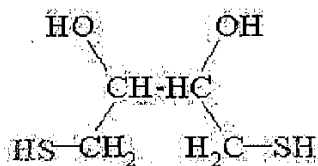
25 Sin embargo, las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas son más propensas a proceder hacia la apoptosis durante el cultivo y el subcultivo de las células simples, de manera contraria a las células madre adultas derivadas de otros tejidos placentarios, y por esta razón, es difícil de inducir la proliferación de las células madre adultas no diferenciadas derivadas de células epiteliales amnióticas en grandes cantidades utilizando métodos de cultivo convencionales. En otras palabras, las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas presentes en un estado no diferenciado pueden ser obtenidas en una gran cantidad únicamente a partir de la placenta recolectada inmediatamente después del parto, y es muy difícil de obtener una gran cantidad de células madre adultas del tejido placentario varias horas después del parto o particularmente del tejido placentario que ha sido almacenado en frío por un periodo prolongado de tiempo. Debido a tal problema, es necesario obtener una gran cantidad de células epiteliales amnióticas de la placenta cosechada inmediatamente después del parto o 35 inhibir la apoptosis de las células madre adultas durante el cultivo celular.

La superficie de la membrana amniótica aislada de la placenta está usualmente cubierta con sangre y moco. Tal moco y similares interfieren con el aislamiento de las células simples provenientes de la membrana amniótica y funcionan para reducir el efecto del tratamiento con tripsina en la técnica anterior. De este modo, se requiere eliminar las impurezas tales como el moco antes del tratamiento con tripsina, y de este modo crear un ambiente en el cual pueda ser elevado al máximo el efecto de la tripsina utilizada para el aislamiento de las células simples. 40

La presente invención se refiere a un método para obtener una gran cantidad de células epiteliales amnióticas a partir de la placenta cosechada inmediatamente después del parto mediante tratamiento con ditiotreitól (DTT) antes del tratamiento con tripsina, y cultivar las células aisladas en una gran cantidad por inhibición de la apoptosis de las células aisladas, y de este modo se resuelve el problema anteriormente descrito.

45 CTT es un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural 1, que es en general utilizado para la eliminación de enlaces disulfuro de las proteínas, la inhibición de la formación de dímeros en el ADN, la eliminación de moco, y la eliminación de desechos o tejido conjuntivo, y similares, y es un reactivo añadido a muchas composiciones de ensayo biológicas, pero no ha sido utilizado en un proceso de extracción de células madre.

[Fórmula Estructural 1]



50

En la presente invención, la desintegración celular excesiva es prevenida al sustituir el tratamiento con tripsina, el cual es un procedimiento convencional para el aislamiento de células simples, por el tratamiento con DTT, y el rendimiento de las células simples se incrementa al eliminar el moco que interfiere con el efecto de tratamiento con tripsina que va a ser realizado posteriormente.

- 5 En la presente, la concentración de DTT utilizado para el tratamiento es 5-50 mM, y preferiblemente 8-15 mM. En una realización de la presente invención, se utilizaron 10 mM de DTT. Si se utiliza DTT a una concentración de menos de 5 mM, es difícil obtener células simples con alto rendimiento, y si se utiliza DTT a una concentración mayor de 50 mM, puede ocurrir la apoptosis debido a la degradación excesiva de las proteínas.

- 10 Después de que el tejido amniótico humano es tratado con DTT, éste es tratado con una baja concentración de tripsina, con el fin de aislar las células epiteliales amnióticas. La concentración de tripsina es 0,025-0,125%, y preferiblemente de 0,05-0,10%.

- 15 Con el fin de aislar diversos tipos de células del tejido amniótico, el tratamiento con tripsina a concentraciones adecuadas correspondientes a éstas, es requerido, y particularmente, las células epiteliales amnióticas son obtenidas mediante tratamiento con una baja concentración de tripsina. Sin embargo, en la técnica anterior, las células epiteliales no pudieron ser efectivamente aisladas con una baja concentración de tripsina, debido a la interferencia provocada por las impurezas tales como el moco que cubre el tejido amniótico, y por esta razón, han sido utilizadas en general las células madre mesenquimatosas (MSCs) que pueden ser aisladas con una alta concentración de tripsina o colagenasa.

- 20 Sin embargo, la presente invención hace posible que las células epiteliales amnióticas sean efectivamente aisladas incluso con una baja concentración de tripsina, mediante eliminación del moco y sustancias similares, a través del tratamiento del tejido amniótico humano con DTT. Específicamente, la presente invención proporciona un método para aislar las células epiteliales amnióticas con alto rendimiento mediante tratamiento con una baja concentración (0,025-0,125%) de tripsina, no el tratamiento con una alta concentración (0,25-0,5%) de tripsina.

- 25 En la presente, el rendimiento de las células puede ser incrementado mediante la aplicación de una fuerza de corte física a través de una etapa adicional de agitación en torbellino a 2.500-3000 rpm durante 30-60 segundos, inmediatamente después del tratamiento con tripsina. Este proceso adicional tiene una ventaja ya que éste acorta relativamente el tiempo de tratamiento con tripsina y de este modo reduce el daño celular provocado por la tripsina.

- 30 Después de que el tejido amniótico es sometido al tratamiento con tripsina y agitación en torbellino, el material resultante es filtrado, obteniendo de este modo células epiteliales amnióticas deseadas. Preferiblemente, el material resultante es principalmente filtrado a través de una malla de 1-2 mm, y como resultado, el tiempo de exposición *in vitro* de las células puede ser reducido en comparación al caso en el cual se utiliza el tamiz de 100 μm desde el comienzo, incrementando de este modo la viabilidad de las células, reduciendo el tiempo tomado para el aislamiento de las células, y reduciendo el uso del tamiz celular de 100 μm , lo cual conduce a reducción en el coste.

- 35 Cuando las células epiteliales amnióticas aisladas de acuerdo al método anterior son cultivadas en un medio que contiene el inhibidor de cinasa asociada a Rho (ROCK), puede ser obtenida una gran cantidad de células madre adultas.

- 40 Por lo tanto, la presente invención, en otro aspecto más se refiere al método para preparar células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas humanas, comprendiendo el método las etapas de: cultivar las células epiteliales amnióticas humanas, aisladas de acuerdo con dicho método, en un medio que contiene un inhibidor de la cinasa asociada a Rho (ROCK); y recolectar las células madre adultas del caldo de cultivo. Además, la presente invención se refiere a un método para proliferar y mantener las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas humanas, comprendiendo el método subcultivar células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas humanas preparadas de acuerdo al método en un medio que contiene un inhibidor de cinasa asociada a Rho (ROCK).

- 45 Un medio que es utilizado en el cultivo de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas en la presente invención puede ser un medio convencional tal como DMEM (medio de eagle modificado de dulbecco) o K-SFM (medio libre de suero de queratinocitos). El medio puede contener ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, antibióticos, FBS (suero fetal bovino), etc. Los antibióticos pueden ser antibióticos convencionales conocidos en la técnica, y un ejemplo de los mismos puede ser el antibiótico-antimicótico (Gibco).

- 50 Como el medio de cultivo, por ejemplo, puede ser utilizado un medio DMEM (medio de eagle modificado de dulbecco) que contiene FBS (suero fetal bovino), ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico, aminoácidos no esenciales y antibióticos, o un medio K-SFM (medio libre de suero de queratinocitos) que contiene FBS, ácido ascórbico, hidrocortisona, NAC (N-acetil-L-cisteína), insulina y antibióticos, para cultivar las células madre epiteliales amnióticas. En la presente, la proliferación de las células madre epiteliales se mostró que es algo más alta cuando se cultiva en el medio DMEM que cuando se cultivan en el medio K-SFM (Figura 7).

- 55 Particularmente con respecto a los medios, los presentes inventores examinaron la habilidad de las células para proliferar a través del experimento realizado mediante el reemplazo del medio DMEM y K-SFM y, como resultado,

encontraron que, cuando el medio DMEM se reemplazó por el medio K-SFM, la habilidad de las células madre adultas para proliferar aumentó adicionalmente en comparación a cuando únicamente se utilizó continuamente (no reemplazados) el medio DMEM o K-SFM (Figura 8). En este proceso, el reemplazo del medio DMEM por el medio K-SFM se realiza preferiblemente en el subcultivo primario de las células madre adultas.

5 Sin embargo, el medio de cultivo para las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas es muy preferiblemente un medio mixto (Gibco) que consiste en una mezcla 1:1 de DMEM y F-12 (mezcla nutriente). En este momento, el medio mixto puede también contener ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, antibióticos y FBS (suero fetal bovino). En una realización de la presente invención, se utilizaron anti-
micóticos-antibióticos (Gibco) como antibióticos.

10 En la presente invención, las células epiteliales amnióticas simples aisladas ser cultivaron principalmente en un medio que contiene el inhibidor de ROCK (cinasa asociada a Rho) para obtener células madre adultas, y luego ser suibcultivaron en presencia del inhibidor de ROCK, de manera que las células madre adultas son mantenidas en un estado no diferenciado.

15 El inhibidor de ROCK (cinasa asociada a Rho), que es una sustancia que funciona inhibiendo la apoptosis, se sabe que inhibe la sensibilización con Ca^{2+} inducida por agonista de la regeneración de neuritas, la fosforilación de la miosina y la contracción del músculo liso. Más específicamente, se sabe que el inhibidor de ROCK normaliza la estructura anormal de las células musculares que provocan la hipertensión y el asma, y tiene la función de incrementar el flujo sanguíneo al disco óptico, y reducir continuamente la presión intraocular. Con respecto a las propiedades biológicas, se sabe que el inhibidor de ROCK tiene la función de inhibir la apoptosis y mantener las
20 células en un estado no diferenciado. Recientemente, se llevaron a cabo estudios sobre el uso del inhibidor de ROCK para incrementar la viabilidad de las células madre embrionarias humanas aisladas (Watanabe et al., Nature Biotechnology, 25:681, 2007).

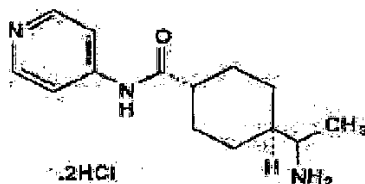
25 Sin embargo, es obvio para aquellos expertos en la técnica que las células madre embrionarias y las células madre adultas son claramente distinguidas una de la otra, de modo que las fuentes y las habilidades de diferenciación de las mismas difieren claramente una de la otra. No ha existido ningún reporte que confirme que la proliferación de las células madre adultas se incrementan por el uso de un inhibidor de ROCK. Sin embargo, en la presente invención se confirmó que la habilidad de las células madre adultas para proliferar aumentó por un inhibidor de ROCK en el aislamiento y cultivo de las mismas, y también la eficiencia de la proliferación del mantenimiento de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas aumentó adicionalmente por el inhibidor de ROCK.

30 En el estudio anterior, conducido por Watanabe et al., se utilizó un método de tratamiento de las células madre embrionarias con un inhibidor de ROCK antes de volver a sembrar las células en un medio reciente para el subcultivo. Específicamente, después de que las células madre embrionarias tratadas con el inhibidor de ROCK se sembraron nuevamente sobre un medio reciente, éstas se cultivaron sin tratamiento con el inhibidor de ROCK (Watanabe et al., Nature Biotechnology, 25:681, 2007).

35 Por otra parte, en la presente invención, un inhibidor de ROCK fue tratado para las células como resiembras para un medio reciente para el subcultivo, estableciendo de este modo un ambiente en el cual el inhibidor de ROCK estuvo continuamente presente durante el subcultivo de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas humanas.

40 Los inhibidores de ROCK típicos que pueden ser utilizados en la presente invención incluyen Y-27632, HA-1077, Y-39983, Wf-536, etc., y entre ellos, se utilizó Y-27632 (Calbiochem o Sigma) en realizaciones ejemplares de la presente invención. Y-27632 tiene la siguiente fórmula estructural 2:

[Fórmula Estructural 2]



45 La concentración del inhibidor de ROCK que se utiliza en el tratamiento de acuerdo con la presente invención está preferiblemente en el intervalo de 10 nM a 100 μ M. Si el inhibidor de ROCK es utilizado en la concentración de menos de 10 nM, será difícil de mantener en un estado no diferenciado de las células madre adultas por un periodo prolongado de tiempo, y si el inhibidor de ROCK es utilizado a una concentración mayor de 100 μ M, puede ocurrir un cambio en la morfología celular, y las células pueden entrar al proceso de diferenciación.

50 Se describen además las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas obtenidas mediante el método como se describe anteriormente. Las características morfológicas e inmunitarias de las células madre

adultas derivadas de células epiteliales amnióticas, obtenidas mediante el método como se describe anteriormente, serán ahora descritas como sigue:

(1) Características morfológicas

5 Las células epiteliales amnióticas simples aisladas del tejido amniótico tienen la morfología típica de células epiteliales rectangulares paralelepípedicas o en forma de dado, ligeramente redondeadas, y el tamaño de las células durante el cultivo de aproximadamente 5-10 μm . En general, las células epiteliales amnióticas se incrementan en tamaño dependiendo de las condiciones de cultivo, mientras que el citosol se incrementa, con lo cual provoca cambio trofoblástico, o es probable que éstas sufran deformaciones asociadas con la transición epitelio-mesenquimatosas mediante el cual las células epiteliales sufren cambios morfológicos dramáticos en el tipo de células madre mesenquimatosas (MSC) (Figura 12). Sin embargo, en la presente invención, las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas tratadas con DTT y cultivadas en un medio que contiene el inhibidor de ROCK mantienen continuamente una forma cuboidal simple (la fotografía de la parte más baja de la Figura 12).

(2) Características inmunológicas

15 Las características inmunológicas de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas de acuerdo con la presente invención se analizaron utilizando un citómetro de flujo y, como resultado, las células fueron positivas para CD9, CD29, CD49f, CD73, CD90 y CD105, y negativas para CD31, CD34, CD45 y CD133 (Figuras 9 y 10).

(3) Estaminalidad

20 Se encontró que, en las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas de la presente invención, fueron expresadas la citoqueratina y la (E)-cadherina epitelial, que indica las características de las células epiteliales, y también fueron expresados SSEA 4, Oct-4, Tra-1-60 y Tra-1-81, que son conocidos como marcadores de las células madre totipotentes (Figura 11).

25 Además, con respecto a la habilidad de diferenciación de las células madre, las células epiteliales amnióticas tienen características más similares a aquellas de las células madre embrionarias como ya son conocidas en la técnica, y de este modo las células madre adultas de la invención derivadas de las células epiteliales amnióticas tienen también habilidad de diferenciación similar a aquellas de las células madre embrionarias, es decir, la habilidad para diferenciarse en células derivadas del endodermo, del mesodermo y del ectodermo. En el presente Ejemplo 6, se confirmó la habilidad de las células madre adultas de la invención para diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y miocitos derivados del mesodermo, y neurocitos derivados del ectodermo.

Se describe además un agente terapéutico celular para tratar heridas en el cuerpo y sobre la superficie del cuerpo, que contiene células madre adultas como un ingrediente activo.

35 Como se utiliza en la presente, el término "herida" significa un daño corporal provocado por medios físicos que dan como resultado la perturbación de la continuidad de las estructuras y se entiende que incluye la destrucción, corte o ruptura, etc., de la piel, la mucosa o el tejido óseo.

El agente terapéutico celular para tratar heridas, que contiene células madre adultas como un ingrediente activo, puede ser administrado directamente al sitio de la enfermedad, además de la administración parenteral en la forma de inyecciones intravenosas o intramusculares. El agente terapéutico celular puede ser administrado mediante diversas rutas, incluyendo las rutas transdérmicas, subcutáneas, intravenosa e intramuscular.

40 Las formulaciones para la administración parenteral incluyen disoluciones o suspensiones, emulsiones, etc., acuosas o no acuosas, estériles. Para las disoluciones y sus suspensiones no acuosas, pueden ser utilizados propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, tal como aceite de oliva, ésteres inyectables tales como oleato de etilo, o similares.

45 Para los seres humanos, el agente terapéutico celular puede ser administrado, en general a una dosis de 10^4 - 10^{10} células/cuerpo, y preferiblemente 10^6 - 10^8 células/cuerpo, una vez o varias veces al día.

50 No obstante, se debe entender que la dosis efectiva de los ingredientes activos debe ser determinada por diversos factores relacionados, tales como la ruta de administración, la enfermedad o padecimiento que va a ser tratado, la edad, género, y peso del paciente, y la severidad de la enfermedad. De este modo, los intervalos de dosis anteriormente mencionados de los ingredientes activos no limitan el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Las células madre adultas pueden ser ventajosamente utilizadas para reparación de tejidos y sanado de heridas. Las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas que poseen características similares a aquellas de las células madre embrionarias tienen la habilidad para diferenciarse en células endodérmicas, mesodérmicas y ectodérmicas, y de este modo pueden ser utilizadas para el sanado de heridas y reparación y

regeneración de tejidos. Además, las células madre adultas pueden diferenciarse, y proliferar y regenerarse dentro del hueso, cartílago, músculo, ligamentos y/o tejidos nerviosos, y de este modo son útiles como un agente terapéutico celular.

Ejemplos

- 5 De aquí en adelante, la presente invención será descrita con detalle adicional con referencia a los ejemplos. Se debe entender, no obstante, que estos ejemplos son para fines ilustrativos únicamente y no deben ser considerados como limitantes del alcance de la presente invención.

Diversos medios y reactivos utilizados en los siguientes ejemplos se adquirieron de las compañías mostradas en la Tabla 1 siguiente.

10

Tabla 1

Artículos		Marcas	Catálogo No.
Medio	DMEM/F-12	Gibco	11320
	EGF	Sigma	E9644
		Peptotech	100-15
		Gibco	13247-051
	FBS	Gibco	16000
	Insulina	Sigma	11882
	Acido ascórbico	Sigma	A 8960
	Antibiótico-antimicótico	Gibco	15240
inhibidor de ROCK	Y-27632	Calbiochem	CNB 688000
		Sigma	Y0503
Solución de Tripsina	Tripsina-EDTA	Gibco	15400
	L/G DMEM	Gibco	11885
Disolución amortiguadora	HBSS	Gibco	14175
Subcultivo	TrypLE-Express	Gibco	12604
DTT	DTT	Gibco	15508-013

Ejemplo 1: Aislamiento de las células epiteliales amnióticas a partir de tejido amniótico mediante tratamiento con DTT (ditiotreitól) y tripsina

- 15 Las membranas amnióticas se recolectaron en los partos normales y en partos prematuros en el Hospital Guro de la Universidad de Corea de acuerdo con las normas del Consejo de Revisión Institucional de la Universidad de Corea, y se utilizaron para fines de investigación. El tejido amniótico requerido en los experimentos se aisló de la placenta, y el tejido aislado se almacenó en una disolución salina fisiológica que contenía antibiótico, o en medio DMEM.

- 20 Se pesaron 5 g de tejido amniótico y se lavaron con HBSS. Para el aislamiento estable de las células epiteliales amnióticas, el proceso de lavado fue llevado a cabo utilizando amortiguador HBSS, más similar a los constituyentes del cuerpo humano en vez de utilizar PBS general. El tejido amniótico lavado se transfirió a un tubo de 50 ml, y se le añadió DTT 10 mM. Después del tratamiento con DTT durante 30 minutos, el sobrenadante se descartó, el tejido amniótico se cortó finamente, y el tejido amniótico finamente cortado se trató con 0,05% de tripsina-EDTA reciente a 37°C durante 42 minutos bajo agitación, degradando de este modo químicamente el tejido. El tejido químicamente degradado se agitó en torbellino durante 1 minuto, y luego se filtró principalmente a través de una malla de 1 mm y secundariamente se filtró a través de una malla de 100 µm, eliminando así tejido no degradado. El tejido filtrado se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos. Los peletes de células individuales en el fondo se suspendieron perfectamente, obteniendo de este modo las células epiteliales amnióticas.
- 25

Las células vivas se contaron visualmente bajo microscopio utilizando un hemocitómetro de acuerdo al método de colorante de azul de tripano, y, como resultado, el número de células contadas inmediatamente después del aislamiento fue $3,72 \times 10^7$ células (Figura 1(A)).

5 Por otra parte, en el caso en el que las células epiteliales amnióticas se aislaron del tejido amniótico mediante tratamiento con tripsina sola sin la adición de DTT, el número de células contadas inmediatamente después del aislamiento fue $9,25 \times 10^5$ células (Figura 1(B)).

10 Como resultado, como se muestra en la Figura 1, el número de células epiteliales amnióticas aisladas mediante el tratamiento con DTT (A) y tripsina y el número de células después del cultivo de las células epiteliales amnióticas (C) fueron significativamente mayores que el número de células epiteliales amnióticas aisladas mediante tratamiento con tripsina sola sin tratamiento con DTT (B) y el número de células después del cultivo de las mismas (D). A partir de esto, se encontró que, cuando el tejido amniótico se trató con DTT, se pudo inhibir la desintegración excesiva de las células y, además, se pudo eliminar el moco que interfiere con el efecto del tratamiento con tripsina que va a ser tratado después de esto, incrementando así adicionalmente el rendimiento de las células epiteliales amnióticas. Además, se confirmó que, conforme se incrementaba el rendimiento de las células epiteliales amnióticas, la cantidad de células madre adultas que pudieran ser obtenidas mediante el cultivo de las células epiteliales amnióticas también aumentó significativamente.

Ejemplo 2: Cultivo de células epiteliales amnióticas en presencia de inhibidor de ROCK

2-1: Cultivo de células epiteliales amnióticas

20 Las células epiteliales amnióticas obtenidas se cultivaron en un medio (Gibco) que consistía de una mezcla 1:1 de DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) y F-12 (mezcla nutriente) a la cual se habían añadido FBS, ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico, insulina, un antibiótico, y $10 \mu\text{M}$ de inhibidor de ROCK Y-27632, a las concentraciones mostradas en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2

Componente	Concentración	Componente	Concentración
Medio basal	mezcla DMEM/F-12 1:1	insulina	5 ug/ml
FBS	10% (v/v)	Acido ascórbico	0,2 mM
EGF	20 ng/ml	Antibiótico-antimicótico	1X

25 Después de 3 días de cultivo, las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas cultivadas se lavaron con amortiguador HBSS, y luego se incubaron con Tryple-express (Gibco) o 0,25% de tripsina-EDTA a 37°C durante 10 minutos. Se le añadió un medio que contenía FBS para inactivar la tripsina, y luego se obtuvieron 5×10^6 células madre derivadas de las células epiteliales amnióticas y se sembraron en un medio reciente y se subcultivaron. Para cada resiembra para subcultivos, se añadieron $10 \mu\text{M}$ del inhibidor de ROCK a cada medio reciente.

30 Los resultados del cultivo de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas llevado a cabo de acuerdo al procedimiento anterior se muestran en la Figura 2. Como se puede observar en la Figura 2, antes de la adición del inhibidor de ROCK, el número de células madre adultas disminuyó, pero cuando se añadió el inhibidor de ROCK 4 días después del aislamiento de las células epiteliales amnióticas, y luego se cultivaron, el número de las células epiteliales amnióticas aumentó rápidamente.

2-2: Comparación de las habilidades de las células madre para proliferar a diversas concentraciones del inhibidor de ROCK

40 Con el fin de examinar el potencial de proliferación de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas a diversas concentraciones del inhibidor de ROCK, las células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 1 se subcultivaron en medio DMEM/F-12 que contenía FBS, ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico, insulina y un antibiótico, al cual había sido añadido el inhibidor de ROCK Y-27632 a diversas concentraciones de $100 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, 100 nM y 10 nM . Después de 1 día y 4 días del subcultivo, se examinó la concentración óptima del inhibidor de ROCK Y-27632 para el cultivo de las células madre adultas.

45 Como resultado, como se muestra en la Figura 3 y en la Figura 4, en el grupo tratado con 10 nM del inhibidor de ROCK, el grado de proliferación no difirió en gran medida de aquel en el control no tratado con el inhibidor de ROCK, y en el grupo tratado con $100 \mu\text{M}$ del inhibidor de ROCK aumentó significativamente la proliferación de las células, pero apareció un cambio en la morfología celular o en la diferenciación celular. De este modo, se confirmó que la

concentración preferida del inhibidor de ROCK estuvo en el intervalo de 10 nM a 100 μ M, y la concentración más preferida fue aproximadamente 10 μ M.

Ejemplo Comparativo 1: Efecto de la adición del inhibidor ROCK sobre la promoción de la proliferación de células madre

5 Con el fin de examinar el efecto del inhibidor de ROCK, 4×10^6 células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 1 se subcultivaron en un medio DMEM/F-12 que contenía FBS, ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico, insulina y un antibiótico, durante 4 días. Luego, las células se sembraron en cada uno de un medio que contenía 10 μ M del inhibidor de ROCK Y-27632 y un medio que no contenía el inhibidor de ROCK, y se observaron 1 día, 2 días, y 3 días después de la siembra.

10 Como resultado, como se puede observar en la Figura 5, cuando las células epiteliales amnióticas obtenidas se cultivaron en ausencia del inhibidor de ROCK, la proliferación de las células madre adultas fue muy lenta debido a la apoptosis. Sin embargo, cuando las células epiteliales amnióticas se cultivaron en presencia del inhibidor de ROCK, se inhibió la apoptosis de las células epiteliales amnióticas, mientras que la proliferación de las células madre adultas aumentó significativamente.

15 El tratamiento con tripsina que ha sido convencionalmente utilizado en el subcultivo tiene un problema por cuanto la eficacia del cultivo se reduce debido a la necesidad de la tripsina, pero se puede observar que la adición del inhibidor de ROCK activó la proliferación de las células madre adultas al prevenir la apoptosis provocada por el tratamiento con tripsina y la inhibición de la diferenciación celular, mientras que ayudó a la proliferación estable de las células madre adultas no diferenciadas.

20 **Ejemplo 3: Comparación de las habilidades de las células madre para proliferar de acuerdo al periodo de tratamiento del inhibidor de ROCK**

Con el fin de mejorar adicionalmente la habilidad de proliferación de las células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 1, se comparó el método utilizado en el estudio de células madre embrionarias (Watanabe et al., Nature Biotechnology, 25:681, 2007) y el método de adición del inhibidor de ROCK durante el cultivo. En otras palabras, el cultivo en el cual se añadieron 10 μ M del inhibidor de ROCK únicamente antes de la resiembra se comparó con el cultivo en el cual se añadió el inhibidor de ROCK incluso después de la resiembra.

30 Como resultado, como se puede observar en la Figura 6, en el caso (A) del tratamiento con el inhibidor de ROCK únicamente antes de la resiembra, la habilidad de proliferación de las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas aumentó claramente en comparación al control sin el tratamiento con el inhibidor de ROCK. Mientras tanto, en el caso (B) en el cual se añadió continuamente el inhibidor de ROCK durante la resiembra y el procedimiento de cultivo, la habilidad de proliferación de las células madre adultas fue superior en comparación al caso (A) en el cual el inhibidor de ROCK se añadió únicamente antes de la resiembra. En otras palabras, en el caso (B) en el cual el inhibidor de ROCK se añadió continuamente incluso durante el cultivo después de la resiembra, la habilidad de proliferación de las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas aumentó muy significativamente.

Ejemplo 4: Incremento en la habilidad de proliferación de las células madre de acuerdo al reemplazo del medio durante el cultivo de las células epiteliales amnióticas

Las células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 1 se cultivaron en cada uno del medio DMEM y el medio K-SFM durante 3 días, 6 días y 8 días, respectivamente.

40 El medio DMEM se suplementó con FBS, factor de crecimiento epidérmico, ácido ascórbico, aminoácidos no esenciales y un antibiótico, y el medio K-SFM se suplementó con FBS, factor de crecimiento epidérmico, ácido ascórbico, hidrocortisona, NAC, insulina y un antibiótico. Como resultado, como se muestra en la Figura 7, se observó que la habilidad de proliferación de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas fue más alta en el medio DMEM que en el medio K-SFM.

45 Mientras tanto, se realizaron experimentos diversificados para la producción en masa de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas. Como resultado, como se puede observar en la Figura 8, el método de reemplazar el medio DMEM por el medio K-SFM en el subcultivo primario incrementó la proliferación de las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas. Además, cuando las células madre adultas se cultivaron en el medio DMEM durante 4 días y se observaron, las células madre proliferaron casi a la misma velocidad similar. Además, cuando el medio DMEM se reemplazó por el medio K-SFM después de 4 días de subcultivo primario, y las células se cultivaron en medio reemplazado durante 2 días, las células madre adultas cultivadas en el medio K-SFM reemplazado mostraron mayor habilidad de proliferación en comparación con las células madre adultas cultivadas en el medio DMEM solo, sin reemplazo del medio.

Ejemplo 5: Características de las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas

55 5-1: Análisis de citometría de flujo de la expresión del antígeno de superficie

Las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas cultivadas en el Ejemplo 2 se caracterizaron por marcadores antigénicos superficiales de la serie CD. CD9 (célula epitelial, adhesión), Se aplicaron CD29 (marcador de células mononucleares), CD31 (marcadores de células endoteliales y de células madre), CD34 (marcadores de células madre hematopoyéticas), CD45 (PTPR, ASV, marcador de leucocito), CD49f (marcador de la integrina alfa 6), CD73, CD90 (marcador de células madre mononucleares), CD105 (marcador TGF beta 1), y CD133 (marcador de células madre hematopoyéticas) para el análisis de FACS.

Las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 2 se lavaron con PBS y se trataron con tripsina. Luego, las células se recolectaron y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Después de que el sobrenadante se desechó, las células se añadieron a una disolución amortiguadora de bloqueo (5% de suero (suero de cabra normal + suero de caballo normal)) y se incubaron a 4°C durante 60 minutos, seguido de la centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Después de que se desechó el sobrenadante, las células se suspendieron en PBS y aplicaron a cada pocillo a una densidad celular de 1×10^5 células, que es el mismo número de un control negativo y los marcadores antigénicos CD. Se añadió un anticuerpo monoclonal anti-humano de ratón conjugado a R-ficoeritrina (PE)/FITC (isotiocianato de fluoresceína) a cada pocillo, y las células se incubaron a 4°C durante 40 minutos. Después de la incubación, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de que se eliminó el sobrenadante, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de que se eliminó el sobrenadante, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de que se eliminó el sobrenadante, las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo.

Las células se tiñeron con CD9 anti-humano conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Becton-Dickinson), CD34 (Becton-Dickinson), CD45 (Becton-Dickinson), CD105 (Becton-Dickinson) y CD29 anti-humano conjugado a PE (ficoeritrina) (Becton-Dickinson), CD31 (Becton-Dickinson), CD49f (Becton-Dickinson), CD73 (Becton-Dickinson), CD90 (Becton-Dickinson), y CD133 (Miltenyi biotec). Se utilizó una muestra réplica como un control no teñido para asegurar la especificidad.

Como resultado, como se muestra en las Figuras 9 y 10, con respecto a las características inmunológicas, las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas fueron positivas para CD9, CD29, CD49f, CD73, CD90 y CD105, y fueron negativas para CD31, CD34, CD45 y CD133.

5-2: Estaminalidad de las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas

Las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 2 se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con PBS que contenía 4% de paraformaldehído, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de que las células se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos cada vez, las células se sometieron a permeabilización con PBS que contenía 0,1% de Triton-X100 a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de que las células se lavaron tres veces con PBS por 3 minutos cada vez, las células se incubaron con el amortiguador de bloqueo (2,5% de disolución de suero, NSG + NHS) a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se incubaron con el PBS que contenía el anticuerpo primario a temperatura ambiente durante 1 hora. Las células se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos cada vez, y se incubaron con un anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 30 minutos en condiciones de oscuridad. Las células se lavaron tres veces con PBS, y luego se montaron. Las células obtenidas de este modo fueron examinadas para la especificidad de SSEA 4, Oct-4, Tra-1-60, Tra-1-81, Citoqueratina y E-cadherina.

Como resultado, como se muestra en la Figura 11, las células madre adultas de acuerdo con la presente invención fueron positivas para SSEA 4, Oct-4, Tra-1-60 y Tra-1-81, las cuales pueden ser consideradas como marcadores de células no diferenciadas, es decir, marcadores de células madre. También, las células madre adultas fueron positivas para citoqueratina y E-cadherina, que pueden ser consideradas como marcadores de las células epiteliales.

5-3: Características morfológicas de las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas

Las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 2 se retiraron de la incubadora y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 a una amplificación de 100x. También, las células se fotografiaron con un AxioCam MRm CCD montado sobre el microscopio. El diámetro de las células se midió utilizando el programa proporcionado AxioVision versión 4.5, y el tamaño del núcleo de las células y el tamaño del citoplasma se examinaron a partir de la fotografía, determinando de este modo la morfología de las células madre derivadas de células epiteliales amnióticas.

Como resultado, como se muestra en la Figura 12, las células madre adultas de acuerdo con la presente invención mantuvieron la morfología típica de las células epiteliales rectangulares paralelepípedicas o en forma de dado, ligeramente redondeadas, y el tamaño (diámetro) de las células durante el cultivo fue aproximadamente 5-10 μm .

55 **Ejemplo 6: Diferenciación de las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas**

6-1: Diferenciación en adipocitos

5 Las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 2 se cultivaron en medio de inducción de adipogénesis (Medio AdipoDiff No Hematopoyético; Miltenyi Biotec) durante 3 semanas (37°C; 5% de CO₂; ciclo de reemplazo del medio: 3-4 días) para inducir la diferenciación de las células madre pluripotentes en adipocitos. 21 días (3 semanas) después del inicio del cultivo, las células se analizaron utilizando el método de tinción con Oil red O. Como resultado, se puede observar que las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas de acuerdo con la presente invención se diferenciaron en adipocitos (Figura 13).

6-2: Diferenciación en células osteogénicas

10 Las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 2 se cultivaron en medio de inducción de osteogénesis (Medio OsteoDiff No Hematopoyético; Miltenyi Biotec) durante 2 semanas (37°C; 5% de CO₂; ciclo de reemplazo del medio: 3-4 días) para inducir la diferenciación de las células madre pluripotentes en células osteogénicas. 14 días (2 semanas) después del inicio del cultivo, las células se analizaron utilizando el método de tinción con rojo de alizarina S. Como resultado, se puede observar que las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas se diferenciaron en células osteogénicas (Figura 13).

6-3: Diferenciación en miocitos

15 Las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 2 se cultivaron en medio de inducción miogénico (Medio de Células del Músculo Esquelético, LONZA) durante 3 semanas (37°C; 5% de CO₂; ciclo de reemplazo del medio: 3-4 días). 21 días (3 semanas) después del inicio del cultivo, las células se inmunotifieron.

20 Como resultado, las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas de acuerdo con la presente invención mostraron tinción positiva para la miosina que es un antígeno específico de las células del músculo esquelético. Esto sugiere que las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas de acuerdo con la presente invención se diferenciaron en miocitos (Figura 13).

6-4: Diferenciación en neurocitos

25 Las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas obtenidas en el Ejemplo 2 se cultivaron en medio de inducción neurogénico (Neural Progenitor Media Systems, LONZA) durante 2 semanas (37°C; 5% de CO₂; ciclo de reemplazo del medio: 3-4 días) para inducir la diferenciación en neurocitos. 14 días (2 semanas) después del inicio del cultivo, las células se inmunotifieron.

30 Como resultado, como se muestra en la Figura 14, las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas de acuerdo con la presente invención mostraron tinción positiva para GFAP (proteína ácido fibrilar glial), O1 (marcador de oligodendrocito) y MAP2 (proteína asociada a los microtúbulos) que son antígenos específicos para los astrocitos en el sistema nervioso. Esto sugiere que las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas de acuerdo con la presente invención se diferenciaron en neurocitos.

Ejemplo 7: Evaluación del efecto de sanado de heridas

35 Las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas se administraron a un modelo de herida de ratón atímico mediante la ruta intradérmica, y luego la habilidad de sanado de herida del mismo se comparó con un grupo de control de disolución salina.

Como los animales de ensayo, se utilizaron ratones atímicos Bald/c-nu Slc de 4-5 semanas de edad (Central Laboratory Animals Inc., Corea) y asignados a 2 grupos como se muestra en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3

Grupo	Dosis	Volumen (μl)	No. de animales	Ruta de administración
Control	0	50 (salina)	6	intradérmica
AEpSC	2 x 10 ⁵ células	50 (salina)	3	intradérmica

40 Después de que los animales fueron asignados a 2 grupos como se muestra en la Tabla 3, se adjuntaron tarjetas de identificación individuales a las jaulas de crianza, y cada animal se crió separadamente en cada jaula de crianza con el fin de identificar cada animal individual. Como un material de ensayo, se prepararon cada uno de 50 μl de disolución salina y 50 μl de 2 x 10⁵ células AEpSC, en una jeringa de insulina de 29G en una mesa limpia 30 minutos antes del inicio del ensayo.

45 1 hora antes de la cirugía, se midió el peso de cada animal de ensayo, se le administró un antibiótico y se anestesió. Luego, la porción central de la espalda de cada animal de ensayo fue desinfectada con algodón con alcohol, y se indujo una herida de espesor completo en la porción central de la espalda utilizando un punzón de biopsia de 5 mm

de diámetro. Inmediatamente después de la inducción de la herida, se inyectó un total de 50 μ l del material de ensayo preparado, en tres sitios intradérmicos cerca de la herida. Los sitios de inyección estuvieron espaciados a aproximadamente 1 cm de la periferia de la herida, con el fin de reducir al mínimo la pérdida del material de ensayo a través de la superficie de la herida.

5 Para examinar el efecto de sanado de herida, la condición de los animales se examinó una vez o más cada día, y la porción de herida se fotografió inmediatamente, 3 días, 6 días, 7 días, 9 días y 14 días después de la cirugía. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 15. La Figura 15 se obtuvo mediante la colocación de papel filtro circular del mismo tamaño que aquel de la herida sobre la herida, fotografiando la herida junto con el papel de filtro circular como el área de píxel de referencia.

10 Como resultado, como se muestra en la Figura 15, se puede observar que la velocidad de cierre de la herida del grupo administrado con las células madre derivadas de células epiteliales amnióticas fue mayor que la del grupo administrado con disolución salina.

Además, 21 días después de la cirugía en la cual la herida inducida se recuperó completamente, los animales de ensayo fueron sometidos a autopsia y se sometieron a una biopsia de piel. Los resultados de la biopsia del tejido en cada grupo después de que la herida inducida fue recuperada se muestran en la Figura 16. Como se muestra en la Figura 16, en la piel del control, existió únicamente una masa de tejido fibroso, mientras que en el grupo administrado con las células madre epiteliales amnióticas, se observó una gran cantidad de apéndices cutáneos tales como folículos pilosos y glándulas sudoríparas en el tejido de la piel recuperada.

20 A partir de tales resultados, se puede encontrar que las células madre epiteliales amnióticas de acuerdo con la presente invención funcionaron para promover la re-epitelialización del tejido de la piel y facilitaron la regeneración de los apéndices cutáneos.

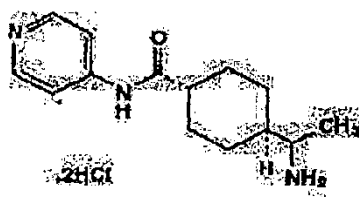
APLICABILIDAD INDUSTRIAL

25 Como se describió anteriormente con detalle, las células madre derivadas de células epiteliales amnióticas humanas de acuerdo con la presente invención son fácilmente extraídas en comparación con las células madre terapéuticas existentes, tales como las células madre de sangre de cordón umbilical y las células madre de médula ósea, el rendimiento inicial de las mismas aumenta mediante el tratamiento con DTT, y la velocidad de proliferación de las mismas aumenta significativamente al cultivarlas en un medio que contiene el inhibidor de ROCK. De este modo, el método de la presente invención puede ser utilizado para preparar eficientemente las células madre adultas útiles como agentes terapéuticos celulares.

30

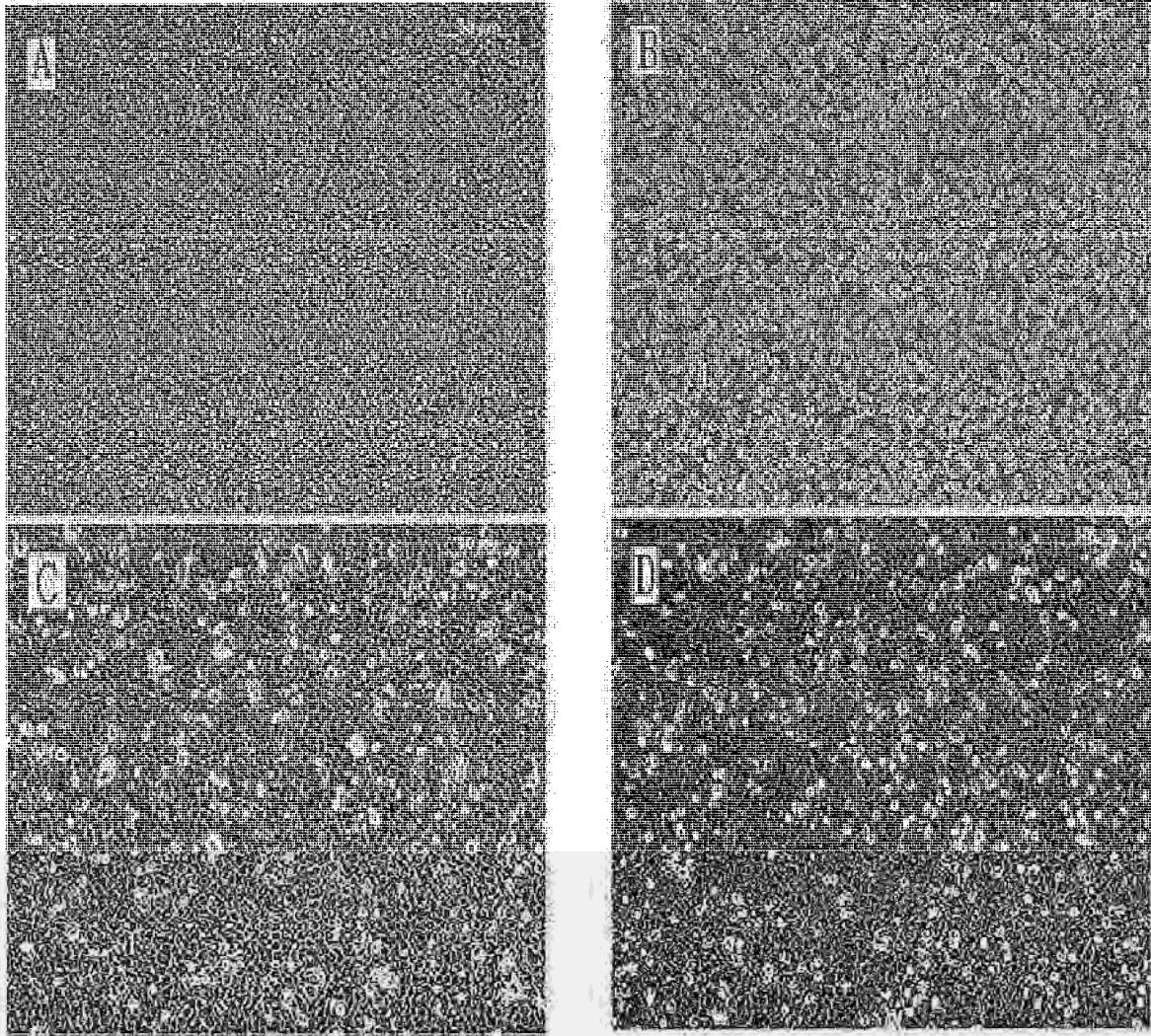
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para aislar las células epiteliales amnióticas, que comprende las etapas de: tratar el tejido amniótico humano de la placenta recolectado inmediatamente después del parto con ditioneitol (DTT) 5-50 mM; tratar el tejido amniótico humano tratado con DTT con 0,025-0,125% de tripsina, y aislar las células epiteliales amnióticas del tejido amniótico.
2. El método para el aislamiento de células epiteliales amnióticas de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa de agitar en torbellino el tejido amniótico humano tratado con tripsina.
- 10 3. Un método para preparar células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas humanas, comprendiendo el método las etapas de: cultivar las células epiteliales amnióticas humanas, aisladas mediante el método de acuerdo con la reivindicación 1, en un medio que contiene un inhibidor de cinasa asociada a Rho (ROCK); y recolectar las células madre del caldo de cultivo.
- 15 4. Un método para proliferar y mantener las células madre adultas derivadas de las células epiteliales amnióticas humanas, comprendiendo el método subcultivar las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas humanas, preparadas mediante el método de acuerdo con la reivindicación 4, en un medio que contiene un inhibidor de cinasa asociada a Rho (ROCK).
5. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que la concentración del inhibidor de ROCK es 10 nM a 100 μ M.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que el inhibidor de ROCK es un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



- 20 7. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que dicho medio es DMEM (medio de eagle modificado de dulbecco) o K-SFM (medio libre de suero de queratinocitos).
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho medio se reemplazó de DMEM a K-SFM en el subcultivo primario de células madre adultas.
- 25 9. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que dicho medio es un medio mixto (Gibco) que consiste en una mezcla 1:1 de DMEM y F-12 (mezcla nutricional).
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el medio contiene adicionalmente ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, antibióticos y FBS (suero fetal bovino).
- 30 11. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el inhibidor de ROCK se añadió cuando se sembraron las células madre adultas derivadas de células epiteliales amnióticas humanas en el medio durante el subcultivo.

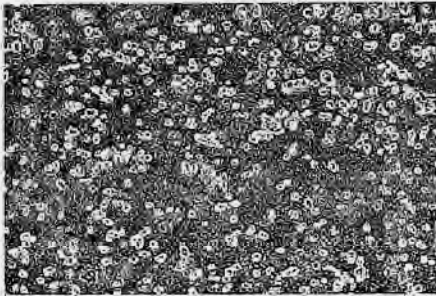
FIG. 1



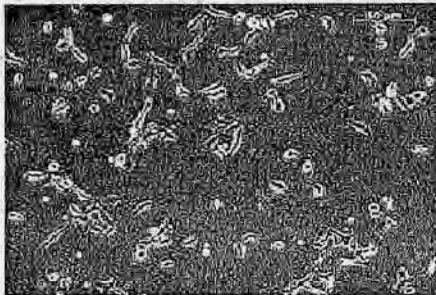
tratamiento con DTT

sin tratamiento con DTT

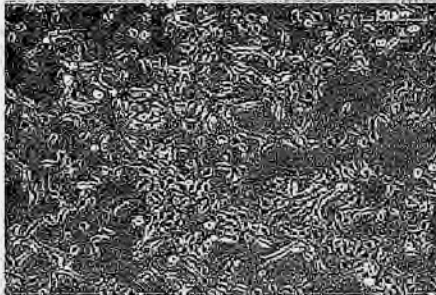
FIG. 2



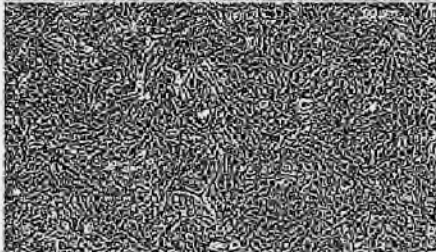
aislamiento



4º día desde el aislamiento
(antes del tratamiento con
inhibidor de ROCK)



1er día tras el tratamiento con
inhibidor de ROCK



3er día tras el tratamiento con
inhibidor de ROCK

FIG. 3

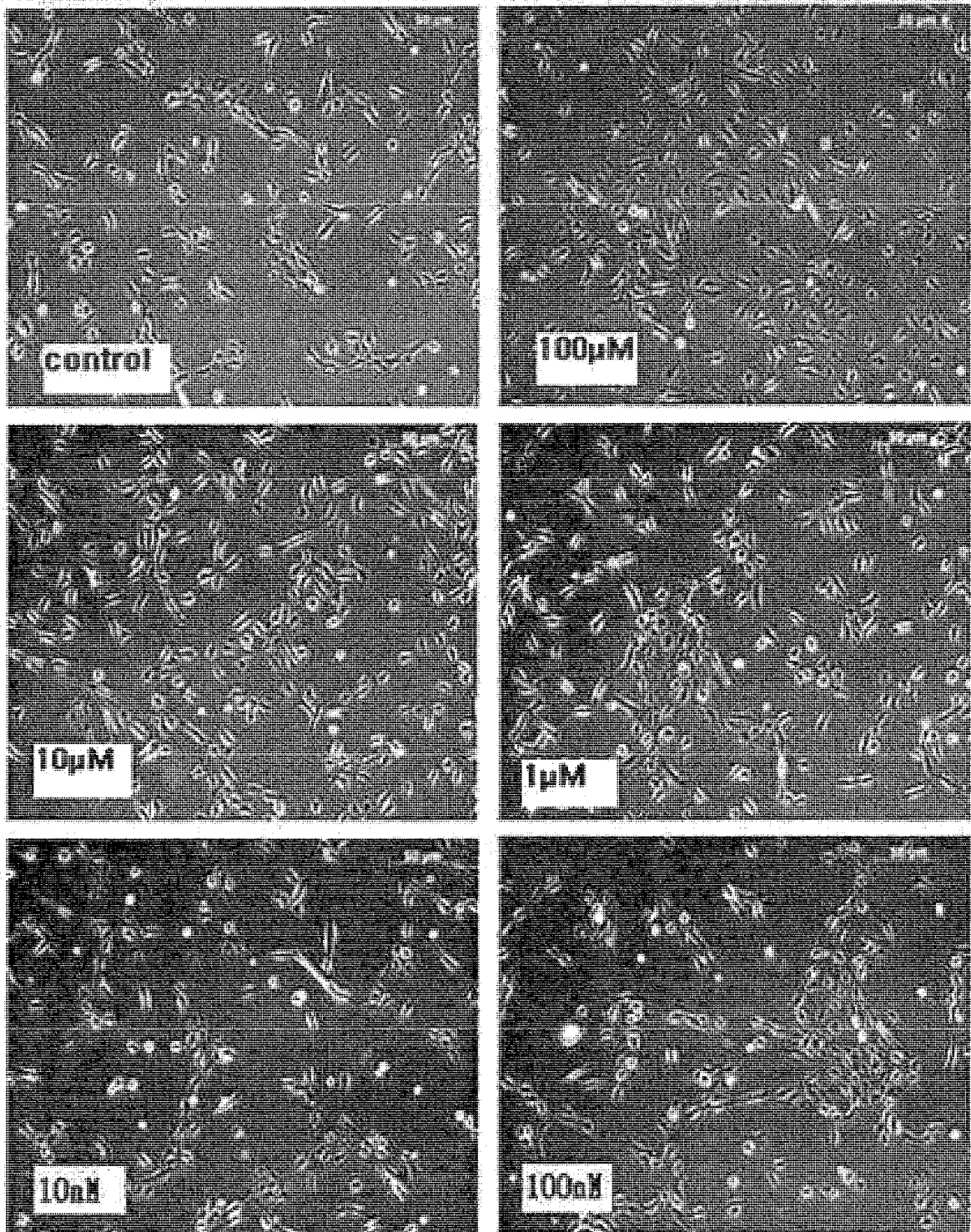
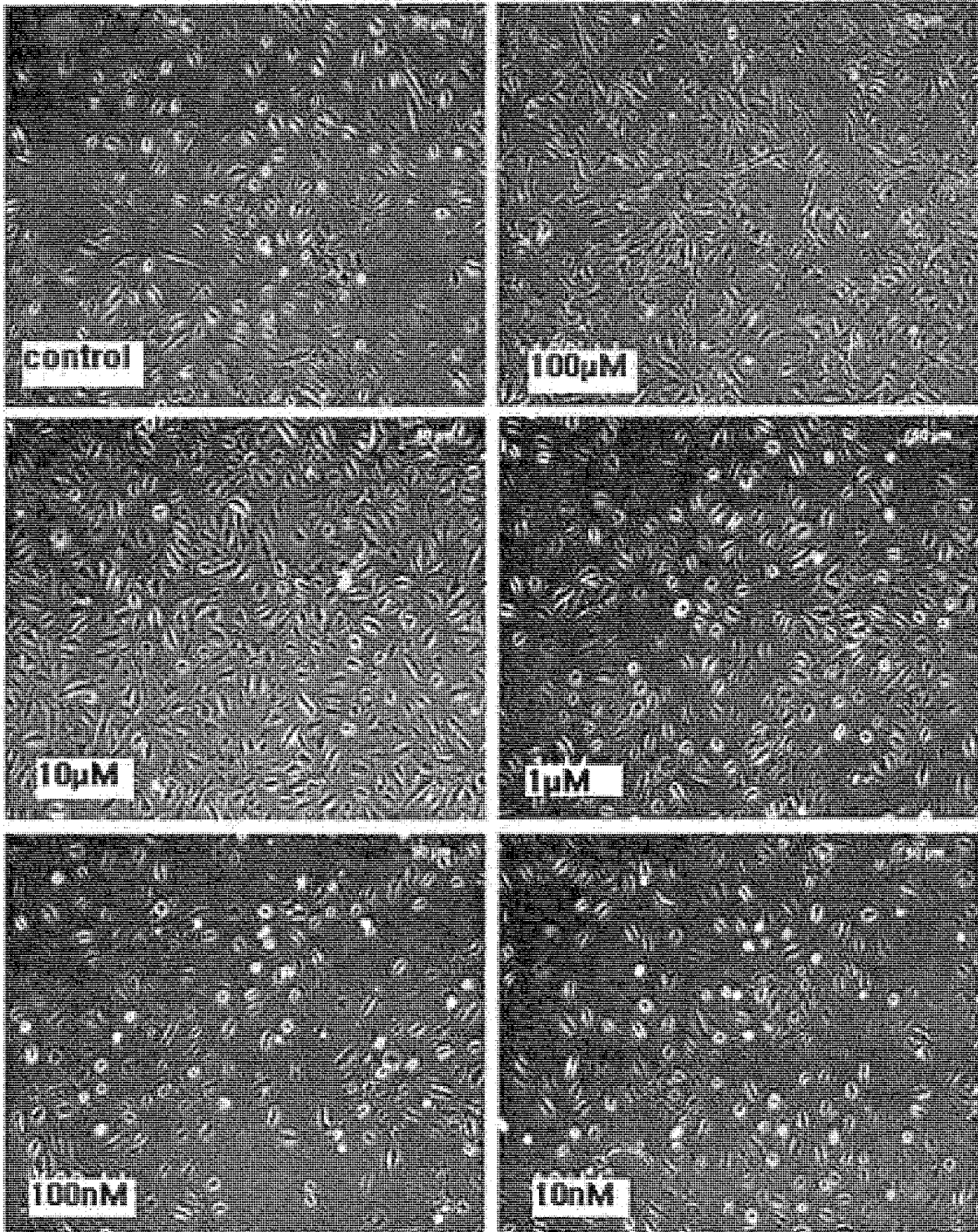


FIG. 4



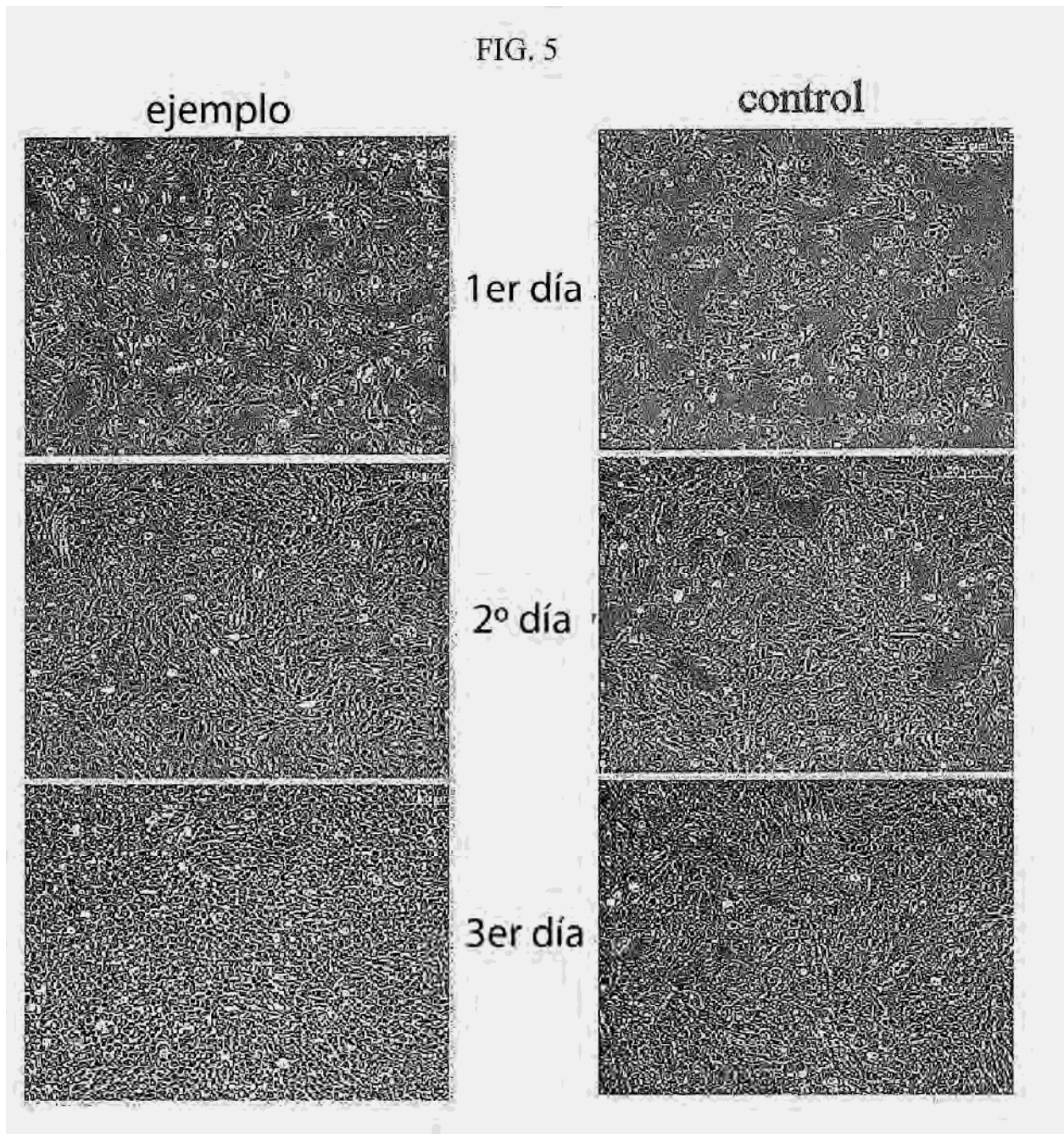


FIG. 6

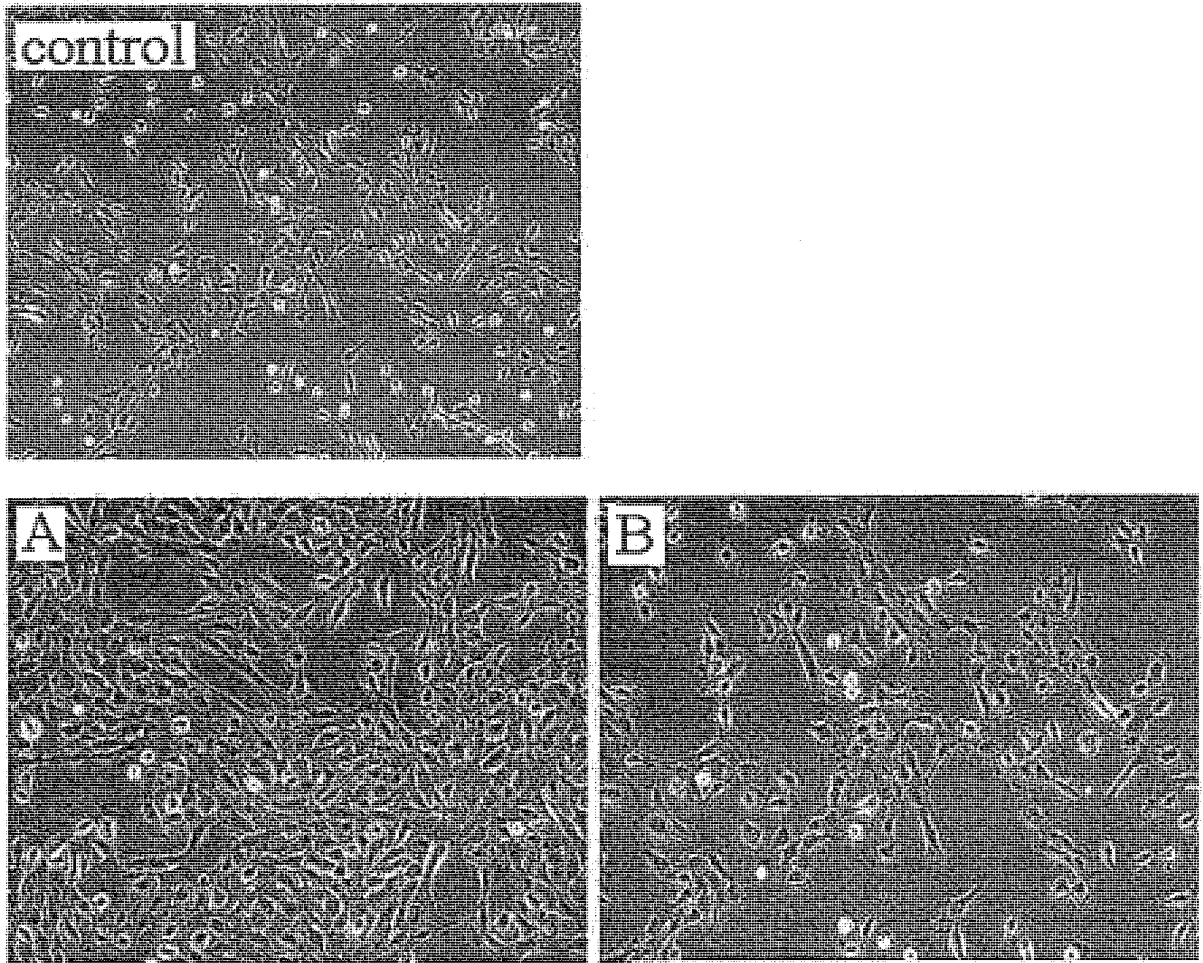


FIG. 7

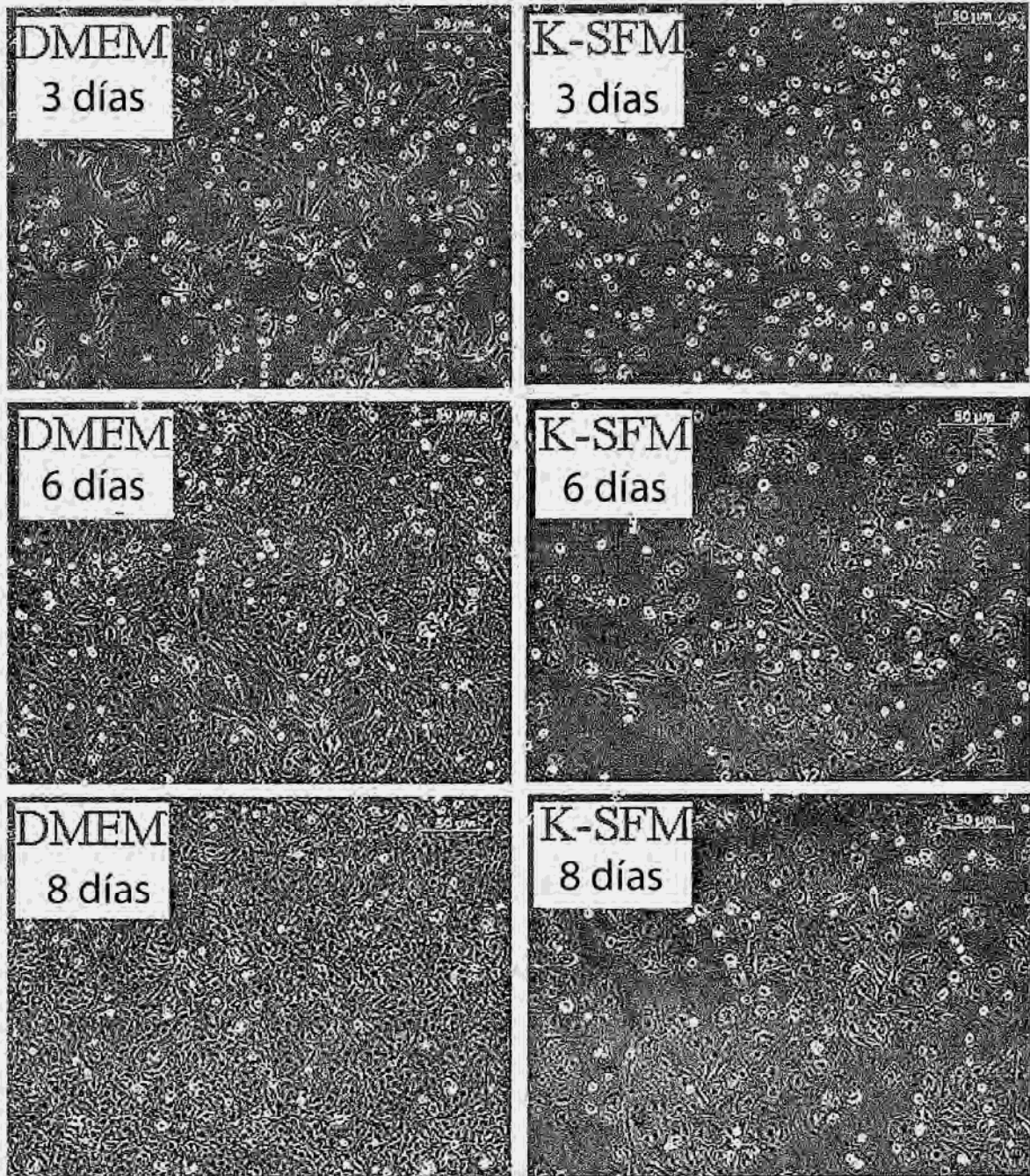


FIG. 8

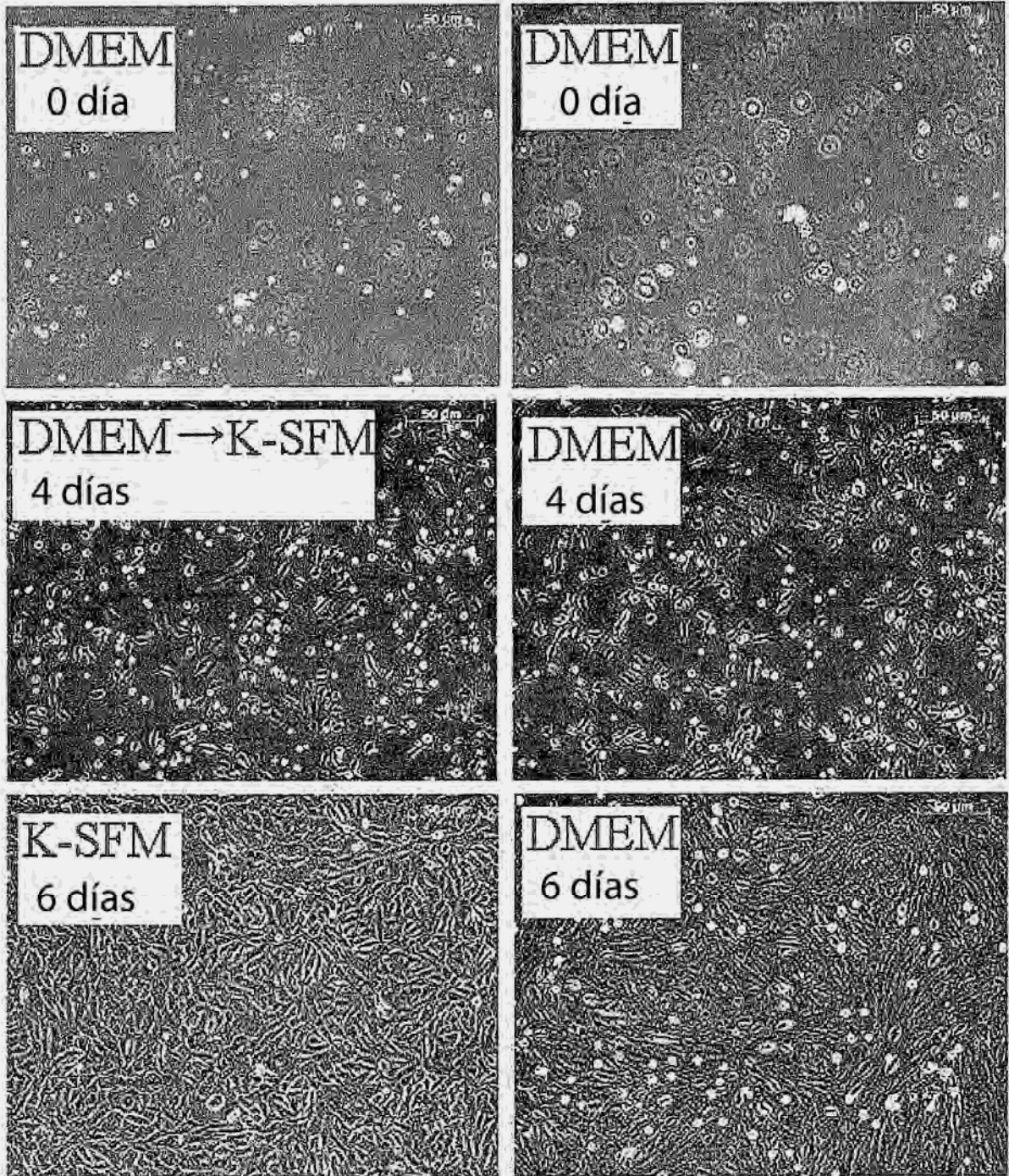


FIG. 9

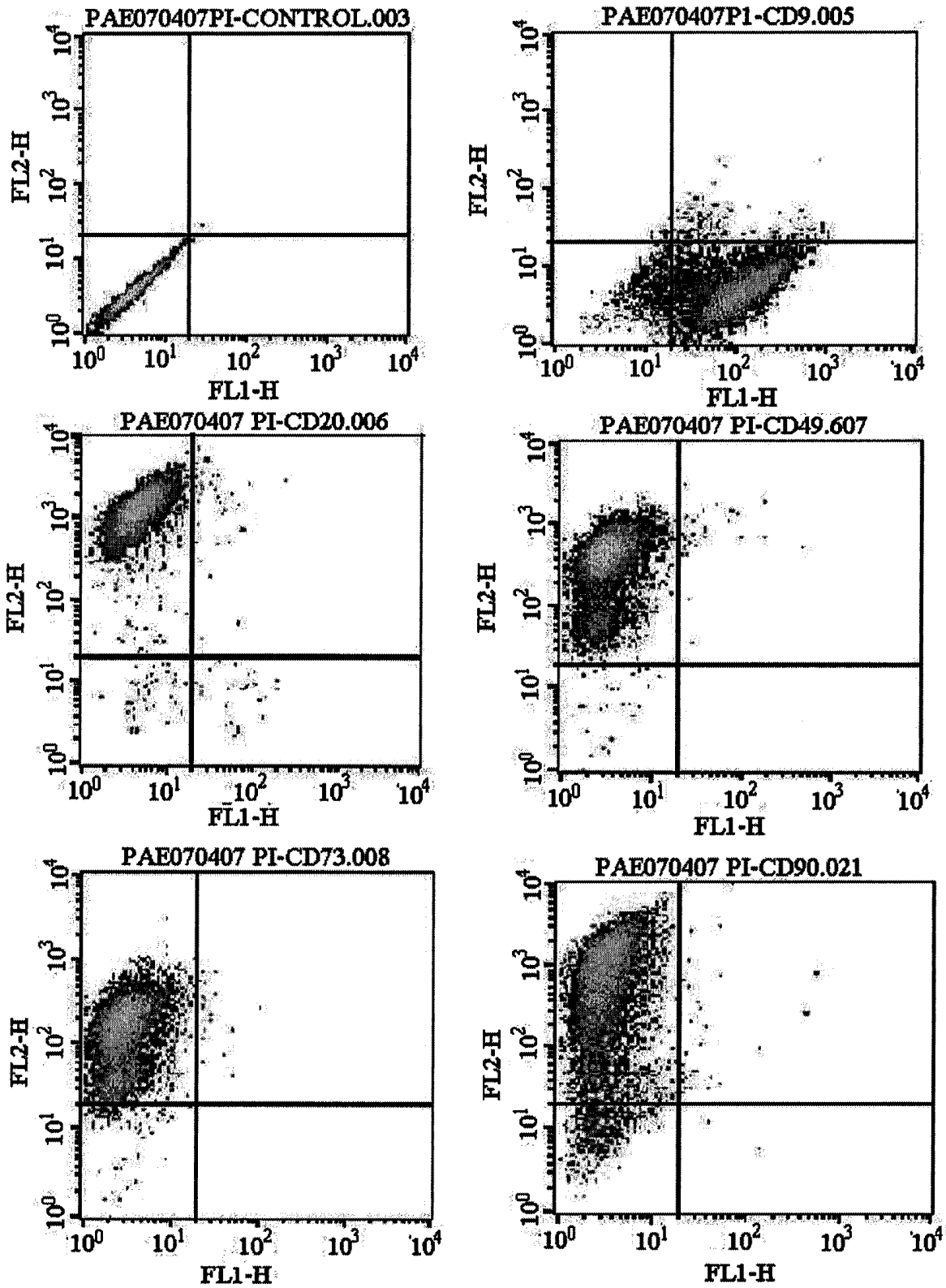


FIG. 10

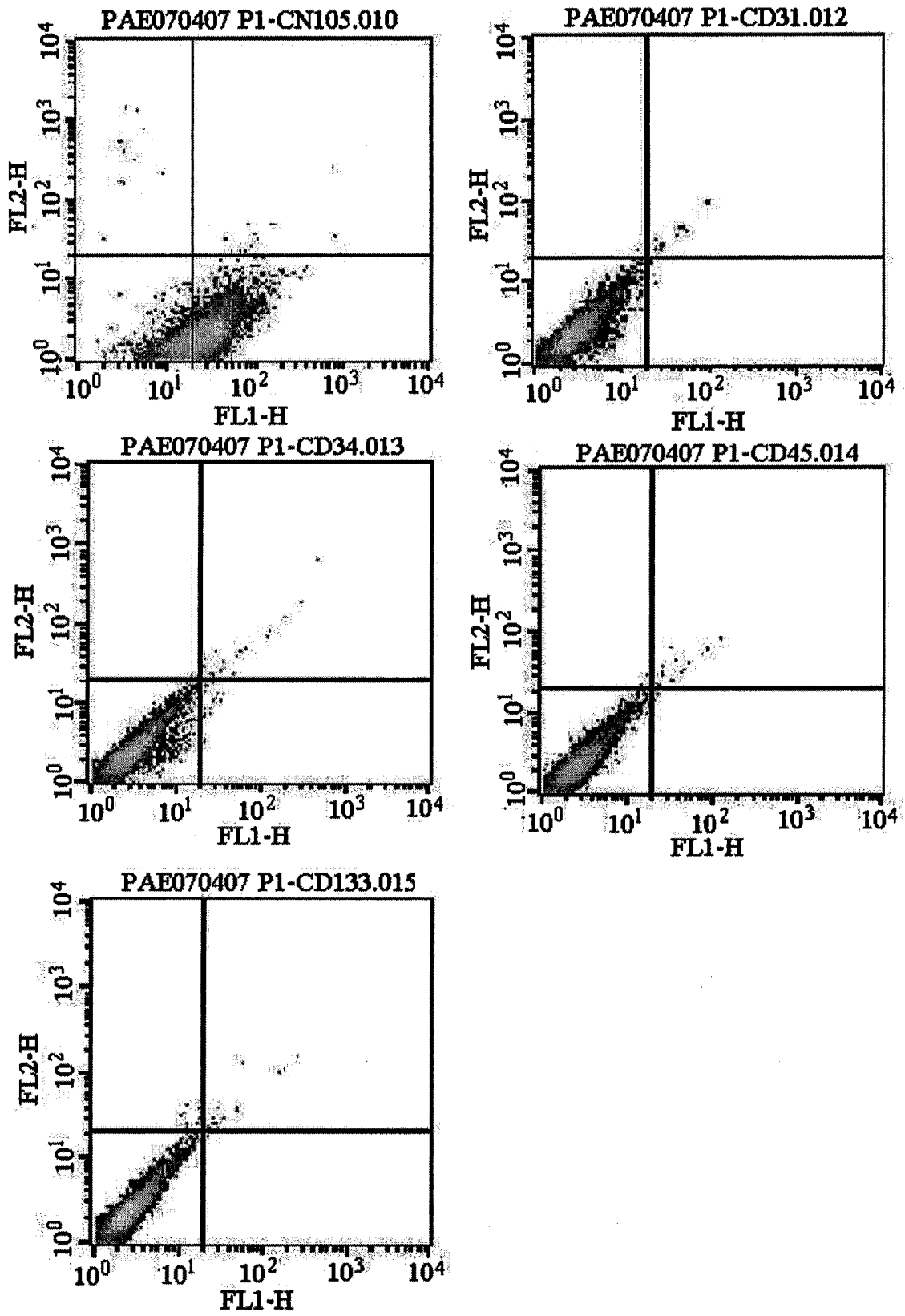
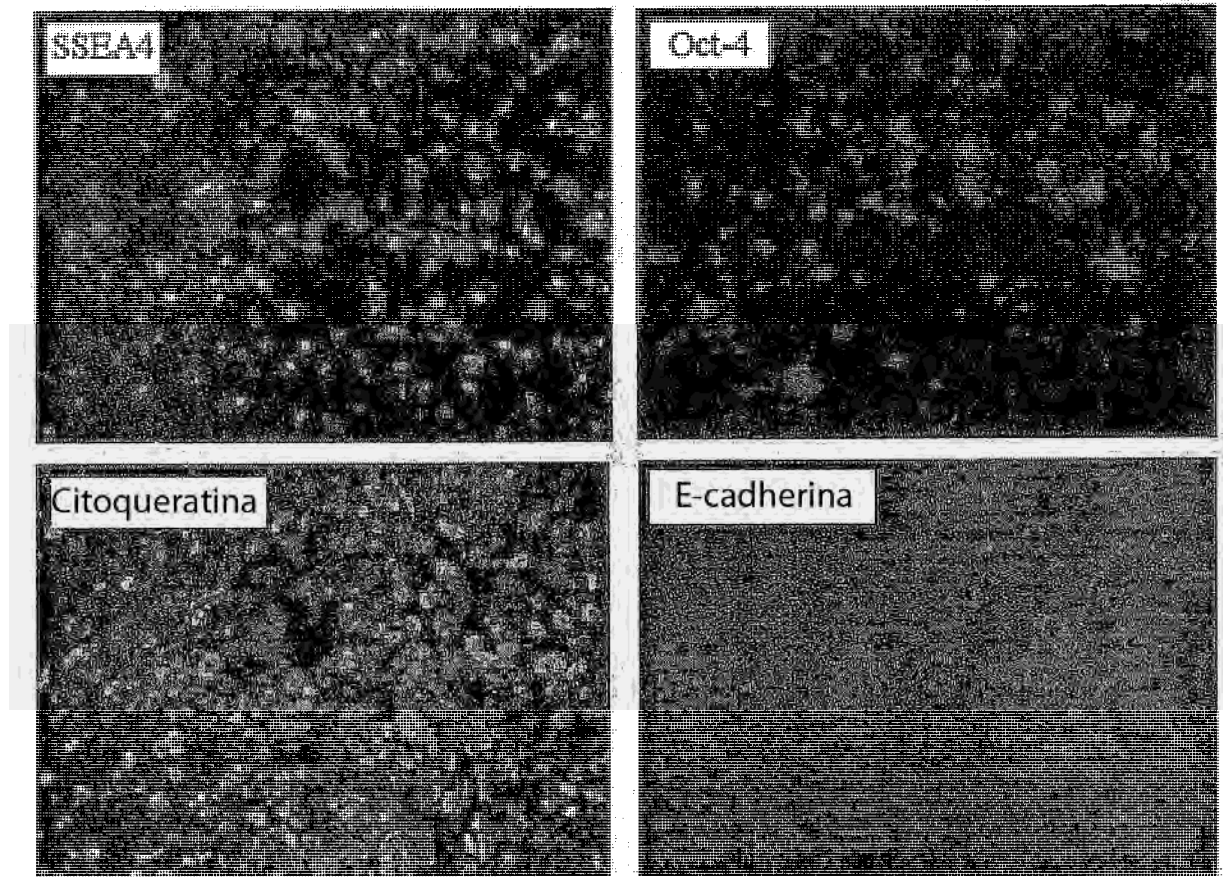
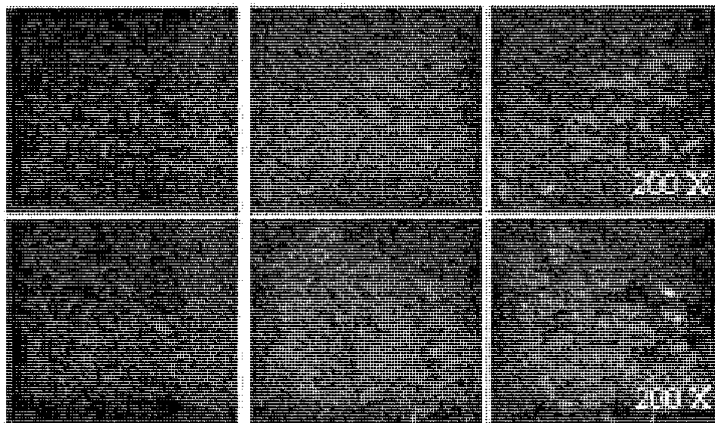


FIG. 11

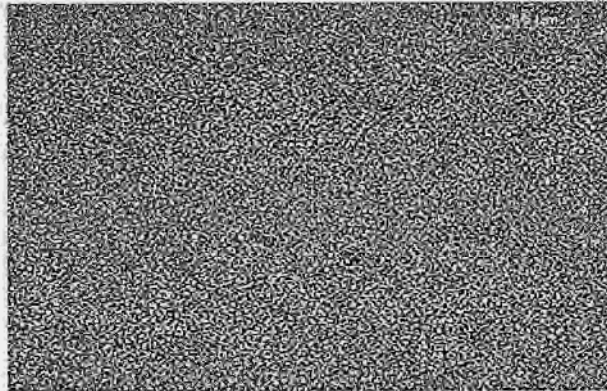


TRA-1-60 DAPI

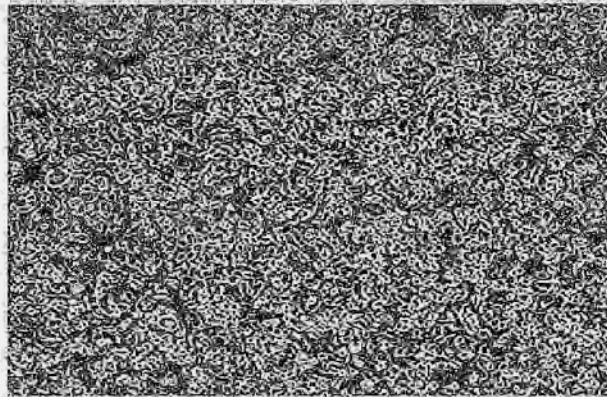


TRA-1-81 DAPI

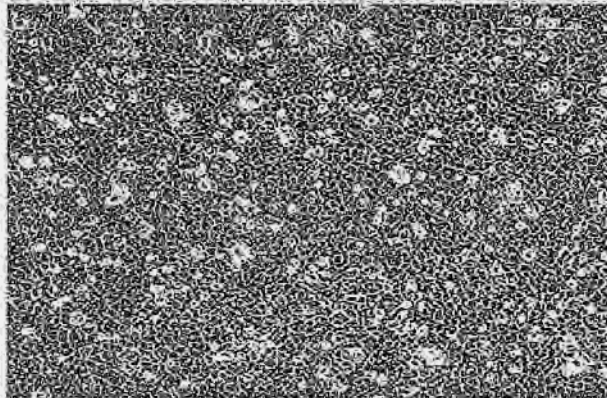
FIG. 12



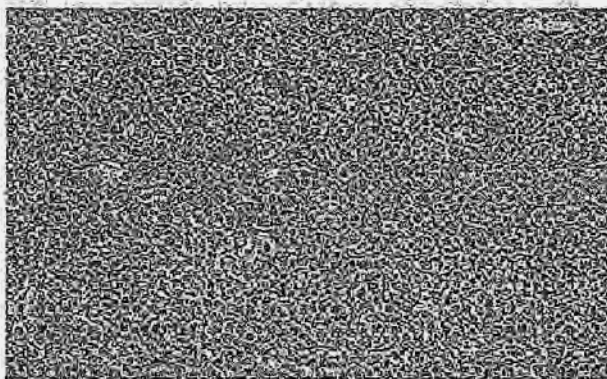
0 día



1 día



3 día



Células madre derivadas
de epitelio amniótico de
la presente invención

FIG. 13

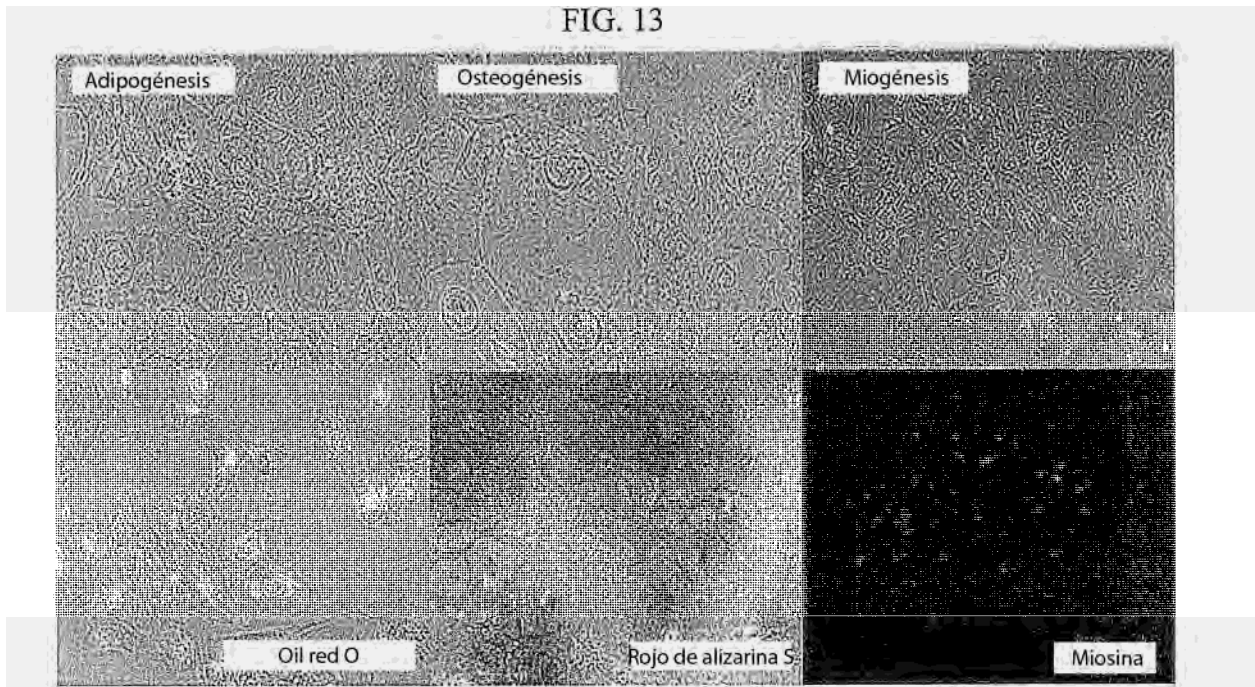


FIG. 14

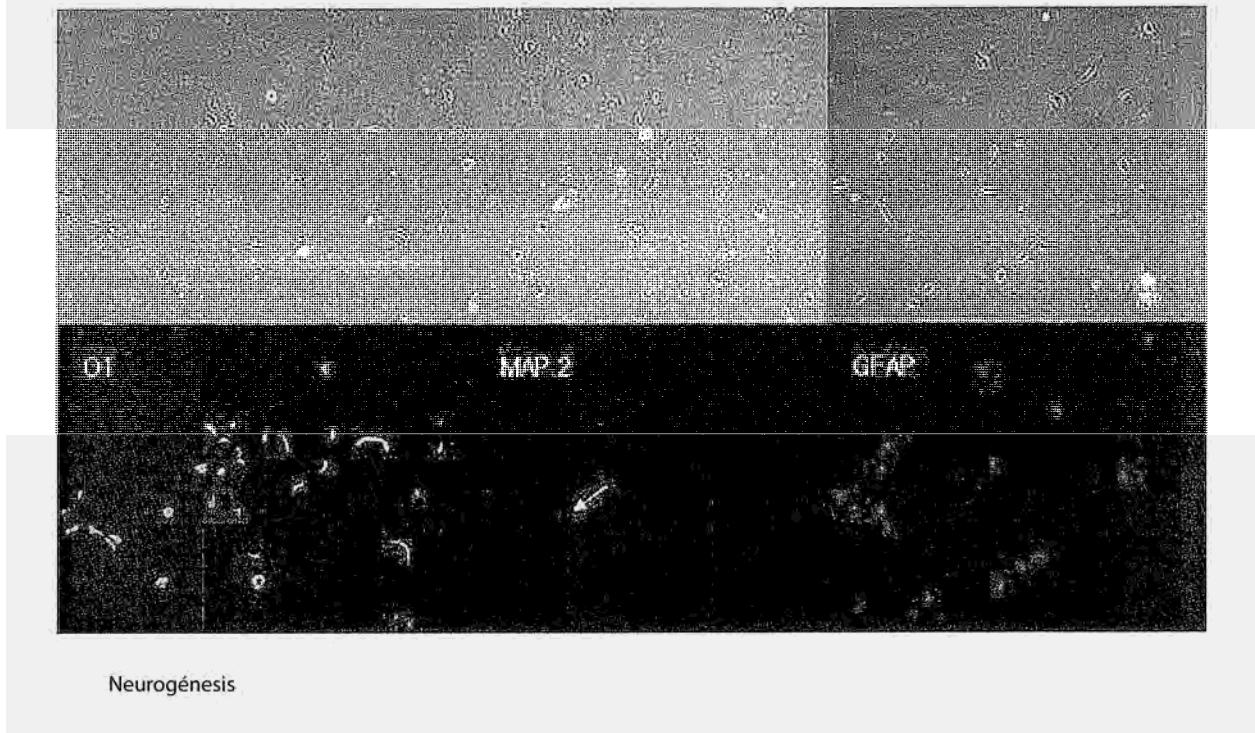


FIG. 15

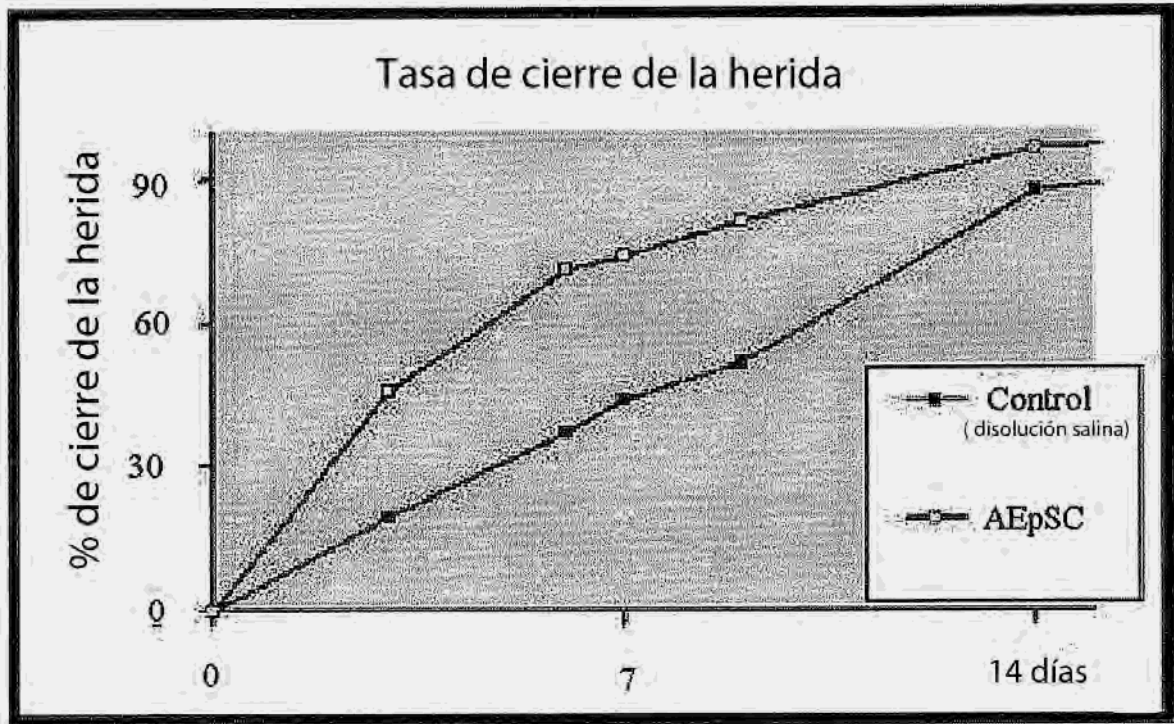


FIG. 16

