

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 443**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2013 PCT/KR2013/003251**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13157850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013 E 13777949 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2840133**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de células madres que tienen el tamaño adecuado para la administración intravascular**

30 Prioridad:

18.04.2012 KR 20120040488

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

03.11.2017

73 Titular/es:

**RA, JEONG CHAN (50.0%)
626-701, Cheongsol Maeul SK Hwanhwa Apt. 918,
Jungja-dong Jangan-gu
Suwon-si, Gyeonggi-do 440-300, KR y
K-STEMCELL CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 640 443 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

Procedimiento de fabricación de células madre que tienen el tamaño adecuado para la administración intravascular

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar células madre que tienen un diámetro de 1-16 μm , que es adecuado para la administración intravascular.

Técnica anterior

10 Las células madre se refieren a células que tienen no solo capacidad de autorreplicación sino también la capacidad de diferenciarse en al menos dos tipos de células, y se pueden dividir en células madre totipotentes, células madre pluripotentes y células madre multipotentes. Las células madre totipotentes son células que tienen propiedades totipotentes capaces de desarrollarse en un individuo perfecto y estas propiedades las tienen las células hasta la etapa celular 8 después de la fertilización de un oocito y un espermatozoide. Cuando estas células se aíslan y trasplantan al útero, se pueden desarrollar en un individuo perfecto. Las células madre pluripotentes, que son células capaces de desarrollarse en diferentes células y tejidos derivados de las capas ectodermo, mesodermo y endodermo, se obtienen de una masa celular interna dentro de los blastocitos generados 4-5 días después de fertilización. Estas células se llaman "células madre embrionarios" y se pueden diferenciar en varias otras células tisulares, pero no forman nuevos organismos vivos. Las células madre multipotentes, que son células madre capaces de diferenciarse solo en células específicas de tejidos y órganos que contienen esas células, están implicadas no solo en el crecimiento y desarrollo de diferentes tejidos y órganos en los periodos fetal, neonatal y adulto sino también en el mantenimiento de la homeostasia del tejido adulto y la función de inducción de regeneración tras el daño tisular. Las células multipotentes específicas de tejido se llaman colectivamente "células madre adultas".

15 Las células madre adultas se obtienen tomando células de diferentes órganos humanos y desarrollando las células en células madre, y se caracterizan porque se diferencian solo en tejidos específicos. Sin embargo, recientemente, experimentos para la diferenciación de células madre adultas en diferentes tejidos, incluyendo células de hígado, han sido muy exitosos, lo cual se ha convertido en el centro de atención. En particular, se han hecho esfuerzos en el campo de la medicina regenerativa para la regeneración de tejidos biológicos y órganos y recuperación de sus funciones que se habían perdido debido a enfermedad o accidente y similares, usando células. Los procedimientos que se usan con frecuencia en este campo de la medicina regenerativa comprenden las etapas de: recoger células madre, células mononucleares derivadas de la sangre o células mononucleares derivadas de la médula ósea de un paciente; inducir la proliferación y/o diferenciación de las células por cultivo en tubo; e introducir las células seleccionadas no diferenciadas (células madre y/o células progenitoras) y/o diferenciadas en el cuerpo del paciente para el trasplante. Por consiguiente, se espera que los procedimientos clásicos existentes para tratar enfermedades por medicación o cirugía sean sustituidos por terapia de sustitución de células/tejidos que sustituye una célula, tejido u órgano dañado por uno sano, y por lo tanto aumentará más la utilidad de las células madre.

25 Por lo tanto, las diferentes funciones de las células madre se están estudiando actualmente. En particular, desde que se ha empezado a prestar atención a la tecnología de terapia celular usando células madre mesenquimales, se ha desarrollado la tecnología para mejorar las células madre mesenquimales para que sean adecuados para fines terapéuticos (WO 2006/019357, patente coreana n° 0795708, y patente coreana n° 0818214).

El documento EP 2837682 describe un procedimiento para prevenir el deterioro y agregación de células madre. El procedimiento comprende suspender las células madre en una solución que contiene aspirina.

40 El documento WO 2011/049414 describe un procedimiento para inducir la migración de células madre adultas derivadas de tejido adiposo, y más específicamente, el tratamiento de células madre adultas derivadas de tejido adiposo con secreciones de proteínas celulares.

45 El documento EP 2811015 describe una composición de medio para rejuvenecer células madre mesenquimales de una persona anciana, conteniendo la composición del medio FBS (suero bovino fetal), un antioxidante, una citoquina y NAC (N-acetil-L-cisteína).

El documento EP 2594636 describe una composición de medio para cultivar células madre mesenquimales, que contiene medio basal, 2-fosfato del ácido L-ascórbico, suero bovino fetal, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), aminoácidos no esenciales (NEAA), insulina, N-acetil-L-cisteína, cloruro cálcico e hidrocortisona.

50 Sin embargo, todavía no se ha estudiado suficientemente la tecnología relacionada con un procedimiento para preparar células madre para la administración intravascular.

55 Por consiguiente, los autores de la presente invención han encontrado que cuando las células madre se cultivan en un medio que contiene un K-SFM (medio de queratinocitos exento de suero) que contiene N-acetil-L-cisteína (NAC), insulina o factor similar a la insulina, hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), FBS (suero bovino fetal), calcio, EGF y selenio, se pueden preparar células madre que tienen

un tamaño adecuado para la administración intracelular, completando así la presente invención.

Descripción de la invención

Problema técnico

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar células madre que tienen un tamaño adecuado para la administración intravascular.

Solución técnica

10 Para lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar células madre que tienen un diámetro de 11-16 µm en un tamaño adecuado para la administración intravascular, comprendiendo el procedimiento: cultivar células madre en un K-SFM (medio de queratinocitos exento de suero) que contiene N-acetil-L-cisteína (NAC), insulina o factor similar a la insulina, hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), FBS (suero bovino fetal), calcio, EGF y selenio.

15 La presente invención también describe una composición de medio para preparar células madre que tienen un tamaño adecuado para la administración intravascular, conteniendo la composición del medio un medio basal; y al menos dos componentes seleccionados del grupo que consiste en N-acetil-L-cisteína (NAC), insulina o factor similar a la insulina, hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF) y antioxidante.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama gráfico que muestra el tamaño de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de acuerdo con el medio y el número de pases.

20 La figura 2 es un diagrama gráfico que muestra el marcador de expresión de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de acuerdo con el medio.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

25 Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. En general, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos experimentales son los conocidos y usados habitualmente en la materia.

Como se usa en el presente documento, el término “células madre” se refiere a células que no solo tienen la capacidad de autorreplicarse sino que también tienen la capacidad de diferenciarse en al menos dos tipos de células. Las “células madre adultas” se refieren a células madre que aparecen o bien en la etapa en la que se forma cada órgano de un embrión después del proceso de desarrollo o en la etapa adulta.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión “células madre mesenquimales” se refiere a células madre no diferenciadas que se aíslan de tejido humano o de mamífero y pueden derivar de diferentes tejidos. En particular, las células madre mesenquimales pueden ser células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical, células madre mesenquimales derivadas de sangre del cordón umbilical, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, células madre mesenquimales derivadas de músculo, células madre mesenquimales derivadas de nervios, células madre mesenquimales derivadas de piel, células madre mesenquimales derivadas de líquido amniótico, o células madre mesenquimales derivadas de placenta. La tecnología para aislar células madre de cada tejido ya es conocida en la materia.

40 Como se usa en el presente documento, “células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo” son células madre adultas no diferenciadas aisladas del tejido adiposo y se denominan también en el presente documento “células madre adultas derivadas de tejido adiposo”, “células madre adiposas” o “células madre derivadas de tejido adiposo”. Estas células se pueden obtener de acuerdo con cualquier procedimiento convencional conocido en la materia. Un procedimiento para aislar células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo puede ser, por ejemplo, el siguiente. Es decir, las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo se pueden aislar cultivando una suspensión que contiene tejido adiposo (en solución salina fisiológica) obtenido por liposucción, y después recogiendo una capa de células madre, unida a un recipiente de cultivo tal como un matraz, por tratamiento con tripsina, o recogiendo directamente los suspendidos en una pequeña cantidad de solución salina fisiológica frotando con un rascador.

50 En la presente invención, “células madre que tienen un tamaño adecuado para la administración intravascular” se refiere a células madre que tienen un diámetro de 11-16 µm, que es menor que el diámetro de las venas o vasos capilares, de modo que las células madre, cuando se administran por vía intravascular, pueden migrar fácilmente a su tejido objetivo sin interferir con el flujo sanguíneo o la circulación y pueden presentar su actividad en el tejido objetivo.

Las células madre se pueden administrar al cuerpo por diferentes vías, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial

o intraperitoneal. Entre dichas vías de administración, se prefiere la administración intravenosa, porque permite tratar una enfermedad de una forma conveniente y segura sin operación quirúrgica. Con el fin de que las células madre administradas por vía intravenosa lleguen al sitio objetivo de forma segura y presenten un efecto terapéutico deseado, deben cumplirse varios requisitos. Primero, las células madre deben tener un tamaño adecuado para la administración intravascular de modo que estas células madre, cuando se administran por vía intravascular, ni reducen la velocidad del flujo sanguíneo ni forman trombos. El grado de proliferación de las células madre mesenquimales que se pueden derivar de diferentes tejidos difiere entre pacientes y varía dependiendo de su origen, condiciones o procedimiento de cultivo, y su tamaño también varía de aproximadamente 10 a 300 μm de diámetro. Sin embargo, las vénulas postcapilares tienen un diámetro de aproximadamente 10-50 μm , las arteriolas tienen un diámetro de 8-30 μm (Schmidt GT, 1989), y los vasos capilares tienen un diámetro de aproximadamente 8 μm (Schmidt GT, 1989; Chien, 1975; John Ross, 1991; Herbert et al., 1989; Arthur y Guyton, 1997; Renkin, 1989; Gaehtgens, 1980; Row 1979), que son más pequeños que el diámetro de las células madre mesenquimales generales. Por lo tanto, cuando se administran por vía intravascular células madre mesenquimales que tienen un tamaño relativamente grande, pueden influir en la actividad intravascular. Específicamente, pueden reducir la velocidad del flujo sanguíneo y también interferir con la circulación sanguínea para producir la detención del flujo sanguíneo, formación de trombo y obstrucción vascular, conduciendo incluso a la muerte. En relación con esto, se ha descrito que cuando las células madre mesenquimales que tenían un diámetro de aproximadamente 16-53 μm se administraban por vía intravenosa a ratones, se reducía la velocidad del flujo sanguíneo y se observaba la inducción de infarto de miocardio y formación de trombo (D. Furlani et al. *Microvascular Research* 77 (2009) 370-376). Por lo tanto, es importante administrar células madre que tengan un tamaño adecuado por una vía intracelular. Además, las células madre no deben deteriorarse o agregarse antes de la administración intravascular, y deben alcanzar de forma segura su sitio objetivo como células individuales sin deterioro o agregación después de la administración intravascular. Además, las células madre deben administrarse a una determinada concentración o concentración mayor de modo que presenten un efecto terapéutico deseado después de que hayan llegado al sitio objetivo. En vista de los varios requisitos descritos antes, la presente invención está dirigida a proporcionar células madre que tienen un tamaño adecuado para la administración intravascular, para así presentar un efecto terapéutico de forma segura sin reducir la velocidad del flujo sanguíneo o formar trombos después de la administración intravascular.

En un aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento para preparar células madre que tienen un diámetro de 11-16 μm , en un tamaño adecuado para la administración intravascular, el procedimiento comprende: cultivar células madre en un K-SFM (medio de queratinocitos exento de suero) que contiene N-acetil-L-cisteína (NAC), insulina o factor similar a la insulina, hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), FBS (suero bovino fetal), calcio, EGF y selenio.

El medio que se usa para obtener las células madre mesenquimales cultivadas se puede enriquecer con aditivos de la técnica, que promueven la proliferación de las células madre mesenquimales en un estado no diferenciado, mientras que inhiben su diferenciación. Además, el medio puede contener un tampón neutro (tal como fosfato y/o bicarbonato en alta concentración) en solución isotónica, y un nutriente proteínico (p. ej., suero tal como FBS, FCS (suero de ternero fetal) o suero de caballo, sustituto de suero, albúmina o aminoácidos esenciales o no esenciales tales como glutamina o L-glutamina). Además, puede contener lípidos (ácidos grasos, colesterol, un extracto de suero de HDL o LDL) y otros ingredientes encontrados en la mayoría de los medios madre de esta clase (tal como insulina o transferrina, nucleósidos o nucleótidos, piruvato, una fuente de azúcar tal como glucosa, selenio en cualquier forma ionizada o sal, un glucocorticoide tal como hidrocortisona y/o un agente de reducción tal como β -mercaptoetanol).

También, con el propósito de prevenir que las células se adhieran unas a otras, se adhieran a una pared del recipiente o formen agrupaciones demasiado grandes, el medio puede contener ventajosamente un agente antiaglutinación, tal como uno vendido por Invitrogen (n^o de cat. 0010057AE).

Entre ellos, se pueden usar ventajosamente uno o más de los siguientes aditivos adicionales:

- factor de células madre (SCF, factor Steel), otros ligandos o anticuerpos que dimerizan c-kit, y otros activadores de la misma ruta de señalización

- ligandos para otros receptores relacionados con tirosina quinasa, tal como el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor estimulador de colonias de macrófagos, ligando Flt-3 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

- factores que elevan los niveles de AMP cíclico, tales como forskolina

- factores que inducen gp130 tales como LIF o oncostatina-M

- factores de crecimiento hematopoyéticos tales como trombopoyetina (TPO)

- factores de crecimiento transformantes tales como TGF β 1

- neurotrofinas tales como CNTF

- antibióticos tales como gentamicina, penicilina o estreptomicina.

5 Específicamente, el medio contiene factor similar a la insulina como sustituto de insulina, que funciona para promover el crecimiento celular potenciando el metabolismo de la glucosa y el metabolismo de proteínas. En particular, se usa preferiblemente el IGF-1 recombinante (factor de crecimiento similar a la insulina 1). El contenido preferido del factor similar a la insulina es 10-50 ng/ml. Si el contenido del factor similar a la insulina es menor de 10 ng/ml, se producirá apoptosis, y si el contenido es mayor de 50 ng/ml, aumentará la citotoxicidad y el coste del medio.

10 El medio contiene factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) que puede inducir diferentes tipos de proliferación celular in vivo. Preferiblemente, se usa el bFGF recombinante. El contenido preferido de bFGF es 1-100 ng/ml.

El antioxidante que se usa en la presente invención es selenio. El contenido de selenio en el medio es preferiblemente 0,5-10 ng/ml. Si el contenido de selenio es menor de 0,5 ng/ml, el medio será sensible a la toxicidad por oxígeno, y si el contenido es mayor de 10 ng/ml, producirá citotoxicidad grave.

15 El medio que se usa en la presente invención contiene un componente seleccionado del grupo que consiste en FBS (suero bovino fetal), calcio y EGF. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) puede inducir diferentes tipos de proliferación celular in vivo, y se usa preferiblemente la proteína EGF recombinante. El contenido preferido del factor de crecimiento epidérmico es 10-50 ng/ml. Si el contenido del factor de crecimiento epidérmico en el medio es menor de 10 ng/ml, no tendrá un efecto particular, y si el contenido es mayor de 50 ng/ml, será tóxico para las células.

20 Las células madre cultivadas en el medio de acuerdo con la presente invención tienen un diámetro de 11-16 μm , y por lo tanto son adecuadas para la administración intravascular.

25 Se describe además una composición de medio para preparar células madre que tienen un tamaño adecuado para la administración intravascular, conteniendo la composición del medio un medio basal; y al menos dos componentes seleccionados del grupo que consiste en N-acetil-L-cisteína (NAC), insulina o factor similar a la insulina, hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), y antioxidante.

30 En un ejemplo de la presente invención, se cultivaron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en el medio. Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo se pueden obtener de la siguiente forma. Primero, se aísla tejido adiposo humano obtenido del abdomen por liposucción o similar, y se lava con PBS, después de lo cual el tejido se corta finamente y se degrada usando medio DMEM que contiene colagenasa. El tejido degradado se lava con PBS y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. Se separa el líquido sobrenadante, y el sedimento que queda en el fondo se lava con PBS y después se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. Las células resultantes se filtran a través de un filtro de malla nº 100 para separar los residuos y después se lavan con PBS. Las células se cultivan durante la noche en medio DMEM (FBS al 10%, NAC 2 mM, ácido ascórbico 0,2 mM), y después las células que no se adhirieron al fondo del recipiente de cultivo se lavan con PBS, y las células se subcultivan mientras el medio se sustituye por medio K-SFM que contiene NAC, ácido ascórbico, calcio, rEGF, insulina e hidrocortisona en intervalos de 2 días, obteniendo así las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. Además de este procedimiento, se puede usar también cualquier procedimiento conocido en la materia para obtener células madre mesenquimales.

40 El procedimiento de preparación de la presente invención puede comprender además la etapa de tratar las células madre, cultivadas en el medio de la presente invención, con tripsina. Cuando las células madre cultivadas se tratan con tripsina, se pueden obtener células madre en forma de células individuales. En el presente documento, la tripsina funciona para inhibir la agregación intercelular de modo que las células se mantienen como células individuales. También se puede usar cualquier sustancia capaz de inhibir la agregación intercelular en lugar de la tripsina.

45 El procedimiento de preparación de la presente invención puede comprender además una etapa de suspender las células madre, cultivadas en el medio de cultivo de la presente invención, en una solución que contiene aspirina. Cuando las células madre cultivadas se suspenden en una solución que contiene aspirina, se puede prevenir eficazmente que las células madre se deterioren o agreguen durante el transporte o almacenamiento. Por lo tanto, las células madre que se usan para la administración intravascular se pueden usar después de que se hayan suspendido en una solución salina fisiológica que contiene aspirina. La solución que contiene aspirina se refiere a una solución que contiene un compuesto aspirina. El disolvente de la solución puede ser solución salina fisiológica. Además de la solución salina fisiológica, se puede usar sin limitación cualquier base, como solución de Hartman-D o PBS (solución salina tamponada con fosfato), que se usa en general en la materia. Como aspirina, se puede usar no solo una formulación de aspirina disponible en el mercado, sino también un compuesto similar a la aspirina. La cantidad de aspirina añadida es preferiblemente 0,0001-0,01 mg/ml. Si la cantidad de aspirina añadida es mayor que el límite superior del intervalo anterior, la viabilidad celular puede disminuir, y si la cantidad es menor que el límite inferior del intervalo anterior, el efecto de inhibición de la agregación celular puede ser insuficiente.

EJEMPLOS

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1: Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

5 Tejido adiposo aislado de tejido abdominal por liposucción se lavó con PBS y se cortó finalmente, después de lo cual el tejido se digirió en medio DMEM enriquecido con colagenasa de tipo 1 (1 mg/ml) a 37°C durante 2 horas. El tejido tratado con colagenasa se lavó con PBS y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Se separó el líquido sobrenadante, y el sedimento se lavó con PBS y después se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Las células resultantes se filtraron a través de un filtro de malla nº 100 para separar los residuos, después de lo cual las células se lavaron con PBS y se cultivaron durante la noche en medio DMEM que contenía FBS al 10%, NAC (N-acetil-L-cisteína) 2 mM y ácido ascórbico 0,2 mM.

15 Después las células no adherentes se separaron por lavado con PBS, y las células que quedaban se cultivaron durante 3 pases, mientras el medio se sustituía por K-SFM (medio de quartinocitos exento de suero) que contenía FBS al 5%, NAC 2 mM, ácido ascórbico 0,2 mM, calcio 0,09 mM, rEGF 5 ng/ml, insulina 5 µg/ml, bFGF 10 ng e hidrocortisona 74 ng/ml) en intervalos de 2 días, aislando así las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo obtenidas por cultivo durante 3 pases en el ejemplo 1, se sembraron en cada uno de los siguientes medios y se cultivaron durante 5 días. A los 5 días de cultivo se midieron el tamaño y las características de las células.

Composición del medio

- 20 1) KSFM + aditivo: K-SFM + FBS + NAC + ácido ascórbico + calcio + rEGF + insulina + bFGF + hidrocortisona + selenio;
 2) DMEM+FGF: DMEM (bajo contenido en glucosa) + FBS al 10% + FGF 5 ng/ml; (referencia)
 3) α-MEM+FGF: α-MEM + FBS al 10% + FGF 5 ng/ml. (referencia)

Tabla 1: Tamaño de las células (µm) de acuerdo con la composición del medio

	Pase 2	Pase 3	Pase 4
KSFM+aditivo	14 ± 2,0	13,8 ± 2,2	14,1 ± 2,4
DMEM+FGF	20 ± 1,7	21,8 ± 1,4	22,1 ± 1,8
α-MEM+FGF	20,3 ± 2,1	19,2 ± 1,8	22,0 ± 1,9

25 El tamaño celular de las células del grupo de cultivo de “KSFM + aditivo” era el más pequeño, y el cambio en el tamaño celular del grupo cultivado usando α-MEM como el medio basal era mayor que el del grupo de DMEM. Las células del grupo de “KSFM + aditivo” mantenían un tamaño de 11-16 µm, mientras que otros grupos de medios mostraban un tamaño celular mayor de 20 µm al aumentar el número de pases (véase la figura 1).

30 Las características de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de 4 pases obtenidas usando el medio de cultivo anterior se analizaron por FACS.

Tabla 2

	KSFM+aditivo	DMEM+FGF	α-MEM+FGF
CD 29	99,0 %	99,4 %	99,9 %
CD 90	99,7 %	99,6 %	99,6 %
CD 31	0,1 %	4,2 %	0,5 %
CD 34	0,0 %	2,3 %	0,2 %
CD 45	0,1 %	4,2 %	2,1 %

Se analizaron las características de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo obtenidas usando

los medios descritos antes, y como resultado, se mostró que el medio no tenía efecto en la expresión de marcadores positivos de las células madre, pero el nivel de expresión de marcadores negativos era ligeramente mayor en las células del grupo de medio de DMEM + FGF que en el células del grupo de medio de "KSFM + aditivo" (véase la figura 2).

- 5 Las células madre aisladas en el ejemplo 1 se observaron por SEM (microscopía electrónica de barrido), y como resultado, se podía ver que las células madre tenían mayoritariamente un diámetro de aproximadamente 11-16 μm y que no se formaba un agregado de las células.

Ejemplo 2: Investigación de los componentes del medio para preparar células madre de tamaño pequeño

- 10 Se prepararon medios exentos de cada uno de FBS, NAC, ácido ascórbico, calcio, rEGF, insulina 5 ng/ml, bFGF, hidrocortisona y selenio, que son ingredientes activos añadidos al medio K-SFM usado en el ejemplo 1, y se cultivaron células madre derivadas de tejido adiposo en el grupo de medio de "KSFM + aditivo" y el medio exento de cada uno de los ingredientes activos. Después de cultivar las células en cada uno de los 3 medios durante 3 pases, las células se trataron con tripsina, y después se midió el diámetro de las células con microscopio confocal. Como resultado, se podía ver que el tamaño de las células madre derivadas de tejido adiposo cultivadas en el medio que contenía selenio era 11,6-16,5 μm , pero el tamaño de las células madre cultivadas en medio exento de selenio era 18,1-23,9 μm .

Aplicabilidad industrial

- 20 De acuerdo con la presente invención, se pueden preparar células madre que tienen un diámetro de 11-16 μm , que migran fácilmente a su tejido objetivo y tienen estabilidad alta. Por lo tanto, se puede aumentar significativamente el efecto de la administración intravascular de las células madre en la terapia celular.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento de preparación de células madres pluripotentes o multipotentes que tienen un diámetro de 11-16 μm en un tamaño adecuado para la administración intravascular, el procedimiento comprende: cultivar células madres en un K-SFM (medio de queratinocitos exento de suero) que contiene N-acetil-L-cisteína (NAC), insulina o factor similar a la insulina, hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), FBS (suero bovino fetal), calcio, EGF y selenio.
- 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además tratar las células madres cultivadas con tripsina.
- 10 3.- El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el procedimiento comprende además suspender las células madres cultivadas en una solución que contiene aspirina.
- 4.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células madres son células madres adultas.
- 5.- El procedimiento de la reivindicación 4, en el que las células madres son células madres mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Fig. 1

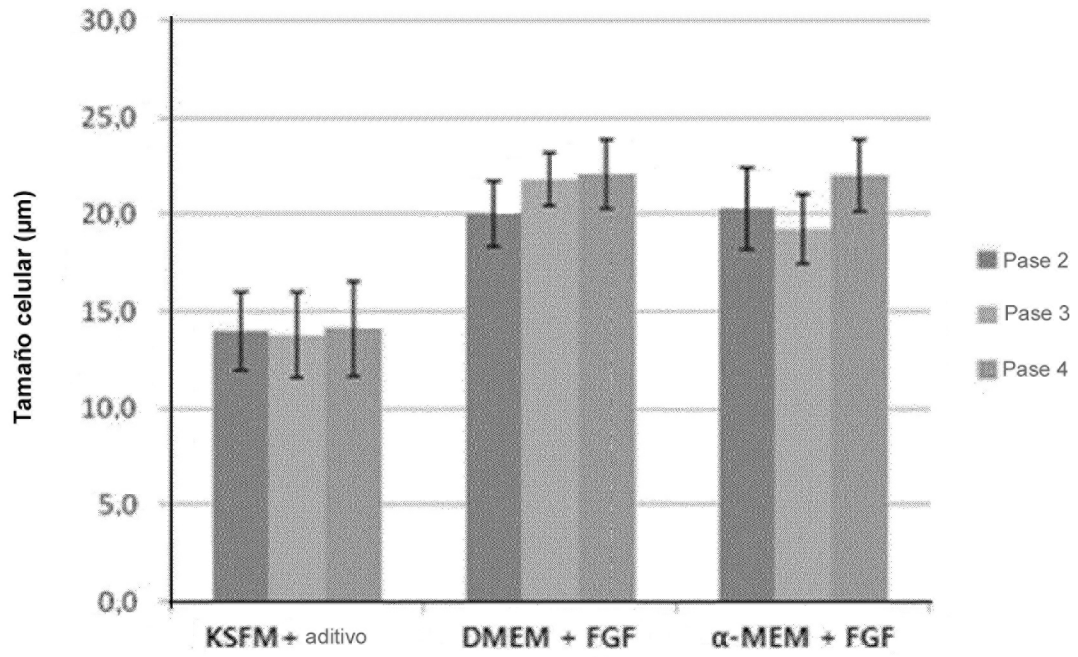


Fig. 2

