

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 898**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**C12N 1/38** (2006.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2011 PCT/KR2011/006582**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13032052**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2011 E 11871607 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2752484**

54 Título: **Método para preparar un medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas, medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas, y agente terapéutico celular cultivado y diferenciado usando el mismo**

30 Prioridad:

**31.08.2011 KR 20110087498**

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

**26.03.2018**

73 Titular/es:

**SEWON CELLONTECH CO., LTD (100.0%)  
4,6th Floor, HP Building 23-6 Yeouido-dong  
Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-724, KR**

72 Inventor/es:

**SUH, DONG-SAM;  
LEE, JUN KEUN;  
CHANG, DONG IL;  
CHOI, MIN JUNG;  
KIM, JANG HOON;  
KIM, GA RAM y  
CHANG, CHEONG HO**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 660 898 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 preparar un medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas, medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas, y agente terapéutico celular cultivado y diferenciado usando el mismo

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un medio de cultivo básico avanzado para células madre mesenquimatosas. También se da a conocer un medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea y grasa; un método para crear un medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas, pudiendo el método, durante el procedimiento de cultivo *in vitro* de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea y grasa, aumentar la tasa de crecimiento de células madre mesenquimatosas en comparación con la técnica convencional de cultivo de células madre mesenquimatosas usando medios comercializados para acortar el tiempo desde la recogida hasta el cultivo en masa, y multidiferenciar las células madre mesenquimatosas cultivadas de manera temprana en agentes terapéuticos de osteoblastos, condrocitos y adipocitos; un medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas; y un agente terapéutico celular cultivado y diferenciado usando el mismo.

10

15

**Técnica antecedente**

20

La tecnología de células madre se ha presentado recientemente como un nuevo campo para el tratamiento de enfermedades incoercibles en medicina regenerativa usando ingeniería de tejidos. Por tanto, hay un interés creciente en el estudio de células madre, y se reconoce que las células madre que pueden formar tejidos a través de proliferación y diferenciación solucionan la mayoría de las enfermedades, el daño tisular, y similares.

25

Las células madre tienen capacidad de autorreplicación en un estado indiferenciado, y se diferencian en células especializadas en condiciones apropiadas. Las células madre pueden dividirse en células madre embrionarias y células madre adultas dependiendo del origen de las mismas. Puesto que se obtienen células madre embrionarias humanas de un embrión con la posibilidad de desarrollarse en un ser humano, surgen problemas bioéticos a pesar de las excelentes capacidades de proliferación y diferenciación celulares de las mismas. Las células madre adultas tienen una capacidad de diferenciación limitada en comparación con las células madre embrionarias, pero son menos problemáticas en cuanto a las cuestiones bioéticas puesto que se recogen células preexistentes en diversos órganos humanos de médula ósea, sangre, cerebro, piel, y similares, produciendo por ello células madre.

30

35

Se aislaron por primera vez células madre mesenquimatosas de médula ósea adulta (Y. Jiang *et al.*, Nature, 418:41, 2002), y luego también se encontraron en tejidos cutáneos, de vasos sanguíneos, musculares y cerebrales, como en médula ósea (J.G. Toma *et al.*, Nat. Cell Biol., 3:778, 2001; M. Sampaloesi *et al.*, Science, 301:487, 2003; Y. Jiang *et al.*, Hematol., 30:896, 2002). Además, se encontraron recientemente, en el tejido adiposo, células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo que tenían capacidad de diferenciación, como en la médula ósea (B. Cousin *et al.*, BBRC., 301:1016, 2003; A. Miranville *et al.*, Circulation, 110:349, 2004; S. Bronthos *et al.*, J. Cell Physiol., 189:54, 2001; M.J. Seo *et al.*, BBRC., 328:258, 2005).

40

45

En la bibliografía, se dan a conocer respectivamente técnicas de aislamiento de células madre mesenquimatosas de médula ósea humana y técnicas de aislamiento de células madre mesenquimatosas de tejidos adiposos por Pittenger, *et al.* (Science 284: 143, 1997) y van, *et al.* (J. Clin. Invest., 58: 699, 1976). En estas referencias bibliográficas, se usaron  $\alpha$ -MEM o DMEM y suero bovino fetal al 10-20% para el cultivo celular.

50

Sin embargo, las células madre mesenquimatosas están muy pocas veces presentes en tejidos adultos, tales como médula ósea y tejido adiposo, y tales células tienen una baja tasa de crecimiento y son difíciles de mantener durante un tiempo prolongado en un estado indiferenciado, y por tanto, tales células son difíciles de conservar a través de proliferación *in vitro* y cultivar sin medios específicamente seleccionados.

55

El medio de cultivo de células de mamífero se compone de aproximadamente 50 componentes, que pueden clasificarse en gran parte en los usados para biosíntesis celular, los usados para el metabolismo energético biológico y los que sirven como catalizadores para varias acciones metabólicas o para regular fenómenos fisiológicos intracelulares. Es decir, los medios usados para el cultivo celular se componen de componentes de disolución isotónica, componentes de disolución tampón, componentes nutricionales incluyendo aminoácidos como fuentes de energía, vitaminas y sales inorgánicas, y otras diversas clases de complementos.

60

65

Además, el suministro de aproximadamente el 5-20% de suero dependiendo de las características celulares proporciona diversas hormonas, factores de crecimiento, grasas y vitaminas, que son adecuados para la proliferación celular, inhiben la actividad de proteasas y sirven como tampón para el ajuste del pH, promoviendo por ello el crecimiento y la actividad de células de mamífero. Como para los componentes que constituyen los medios para cultivar células de mamífero, las concentraciones y la composición de los componentes varían dependiendo del tipo de cada medio. A través de este método, Morgan, *et al.* crearon el medio M119 basándose en la composición de fluidos corporales en la década de 1950, y cultivaron células fetales (pollo primario) (Morgan, *et al.*, 1950).

Los medios de cultivo pueden clasificarse en gran parte en medios que son más sencillos y se usan comúnmente para cultivo celular, tal como medio esencial mínimo (MEM; Eagle, 1955), Rosewel Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Moore *et al.*, 1967) y la modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM; Dulbeco, *et al.*, 1959), y medios que son más complejos y tienen varios componentes enriquecidos, tales como la modificación de Iscove de DMEM (IMDM), F-12 de Ham (Ham, 1965) y Connaught Medical Research Laboratories (CMRL)-1666.

La curva de crecimiento de las células de mamífero tiene una fase de latencia de normalmente 2-3 días, y la concentración de células vivas se reduce rápidamente desde el final de la fase de latencia debido a la acumulación de amonio, que es un metabolito de la glutamina, y ácido láctico, que es un metabolito de la glucosa. La glucosa y la glutamina se usan como fuente de carbono principal y una fuente de energía en las rutas metabólicas principales de células de mamífero. La glucosa se metaboliza dando ácido pirúvico a través de glicólisis en células de mamífero. Además, se prepara pentosa a través de la ruta de la pentosa fosfato, dando como resultado la síntesis de ácido nucleico. El ácido pirúvico generado a través de glicólisis puede descomponerse en dióxido de carbono y agua o puede convertirse en ácido láctico a través del ciclo de los TCA, y también puede convertirse en ácido graso. La glutamina es la única fuente de carbono usada en el metabolismo de células de mamífero. En el proceso metabólico, algo de glutamina se convierte en glutamato, que entonces entra en el ciclo de los TCA para formar un esqueleto de carbono para sintetizar otros aminoácidos. Los principales excrementos de las células de mamífero son ácido láctico y amoniaco, y la excreción de alanina es también importante. El lactato y amoniaco cambian el pH intracelular y el pH lisosómico, y por tanto actúan como toxinas sobre las células. Puesto que los mecanismos fisiológicos y los requisitos nutricionales varían dependiendo del tipo de células cultivadas como tales, también es necesario variar el tipo de medio usado en el cultivo celular dependiendo de las características del medio.

Por tanto, con el fin de hacer proliferar y cultivar *in vitro* células madre mesenquimatosas indiferenciadas derivadas de tejidos adultos, tales como médula ósea humana y tejido adiposo, la composición del medio adecuado para las condiciones de crecimiento de las células madre mesenquimatosas indiferenciadas serán diferentes.

Convencionalmente, muchos estudios sobre medios de cultivo para hacer proliferar y cultivar *in vitro* células madre mesenquimatosas indiferenciadas han estado en curso tal como sigue.

El documento patente 1 (Method for Mass-Producing Growth Factor Using Mesenchymal Stem Cells) da a conocer un medio libre de suero que se complementa con F-12 de Ham basándose en DMEM para promover la diferenciación de factores de crecimiento a partir de células madre mesenquimatosas, sintetizando por ello cantidades significativamente grandes de factores de crecimiento humanos. Sin embargo, éste es un medio básico en el que se mezcla DMEM con F-12 de Ham, para la producción en masa de factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento endotelial vascular o factor de crecimiento transformante-beta a partir de células madre mesenquimatosas en vez de hacer proliferar células madre mesenquimatosas.

El documento patente 2 (Medium Composition Necessary for *In vitro* Proliferation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Blood, Containing Soy Protein Hidrolysate) se refiere a la técnica de añadir un hidrolizado de proteína de soja como componente del medio de cultivo de células madre a un medio DMEM con bajo contenido en glucosa que contiene suero bovino fetal, con el fin de reducir la cantidad del suero bovino fetal.

El documento patente 3 (Method for Preparing Dermal Papilla Tissue Using Mesenchymal Stem Cells) y el documento patente 4 (Method for Preparing Dermal Papilla Tissue Using Mesenchymal Stem Cells) se refieren a la técnica de cultivo de células madre mesenquimatosas en DMEM, DMEM/F-12, F-12, 5A de McCoy, RPMI 1640, medio E de Williams o modificación de Dulbecco modificada por Iscove (IMDM), y luego inducir la diferenciación en tejidos de papilas dérmicas, y describen un medio obtenido añadiendo hidrocortisona, insulina, transferrina y selenito de sodio a un medio de cultivo celular comercializado básico.

El documento patente 5 (Mesenchymal Stem Cell Culture Medium and Method for Culturing Mesenchymal Stem Cells Using Same) se refiere a la técnica de cultivo de células madre mesenquimatosas usando un medio comercializado complementado con una mezcla de nutrientes como base y añadiendo además insulina, hidrocortisona, EGF, LIF, GM-CSF, y similares, que son factores de crecimiento de células madre mesenquimatosas, y describe una técnica de cultivo de mezclado de una mezcla de nutrientes con el medio de cultivo comercializado.

El documento patente 6 (Multipotent Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue and Cellular Therapeutic Agents Comprising Same) se refiere a la técnica de proliferación de células madre mesenquimatosas usando DMEM como base y añadiendo queratinocito-SFM complementado con NAC, rEGF, BPE, insulina, y similares, en el que el medio de cultivo celular básico es DMEM.

El documento patente 7 (Composition for Preventing o Treating Cancer, Containing Adult Stem Cell Culture of Fraction Thereof) y el documento patente 8 (Isolated Pluripotent Adult Stem Cells and Method for Isolating and Culturing Same) se refieren a la técnica de cultivo de células madre mesenquimatosas usando un medio de mezcla de DMEM/F-12 de Ham, DMEM y DMEM/F-12.

Tal como se indicó anteriormente, las técnicas convencionales se limitan al cultivo añadiendo aditivos, tales como

factores de crecimiento, al medio comercializado como base.

Mientras tanto, el documento patente 9 (Chondrocyte-Specific Cultivo Method for Early Culture of Chondrocytes) presentado y registrado por el presente solicitante se refiere al desarrollo del medio de cultivo en el que no se añaden aditivos al medio comercializado convencional. En el documento patente 9, se cultivaron células madre mesenquimatosas aisladas de tejidos adultos, tales como médula ósea y tejido adiposo, usando el medio básico avanzado-condrocito (ABM-C). Sin embargo, se produjeron anomalía morfológica y la pérdida de adhesividad durante el cultivo celular tal como se muestra en la figura 13, y por tanto las células madre mesenquimatosas flotaban sobre el medio de cultivo celular, de modo que las células madre mesenquimatosas que se adhieren y proliferan *in vitro* ya no proliferaban.

Documentos adicionales que se mencionan son: documentos WO 2007/149328 A1; WO 2007/123363 A1; WO 2007/069813 A1; Rakhi Pal *et al.* "Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of bone marrow-derived mesenchymal stem cells"; Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, vol. 3, n.º 3, 1 de marzo de 2009 (01-03-2009), páginas 163-174 y Karolina Turnovcova *et al.*, "Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media", Cytotherapy, vol. 11, n.º 7, 10 de noviembre de 2009 (10-11-2009), páginas 874-885.

**Documentos de la técnica anterior**

Documentos patente

(Documento patente 1) registro de patente coreana n.º 10-0899329

(Documento patente 2) publicación de patente coreana n.º 10-2009-0090850

(Documento patente 3) registro de patente coreana n.º 10-1022032

(Documento patente 4) publicación de patente coreana n.º 10-2010-0110905

(Documento patente 5) registro de patente coreana n.º 10-0908481

(Documento patente 6) registro de patente coreana n.º 10-0679642

(Documento patente 7) publicación de patente coreana n.º 10-2009-0121541

(Documento patente 8) publicación de patente coreana n.º 10-2006-0010847

(Documento patente 9) registro de patente coreana n.º 10-1037002

**Descripción detallada de la invención**

Problema técnico

Por tanto, la presente invención se ha realizado en vista de los problemas mencionados anteriormente, y un aspecto de la presente invención es proporcionar un medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas, que puede cultivar y hacer proliferar de manera masiva células madre mesenquimatosas indiferenciadas derivadas de tejidos adultos, tales como médula ósea humana y tejidos adiposos, a una alta tasa de crecimiento.

Otro aspecto de la presente divulgación es proporcionar un agente terapéutico celular que contiene células madre mesenquimatosas indiferenciadas, en el que el agente terapéutico celular diferencia *in vitro* las células madre mesenquimatosas indiferenciadas, derivadas de células adultas, en osteoblastos, condrocitos y adipocitos, usando el medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas.

Solución técnica

Según la presente invención, se proporciona un medio de cultivo básico avanzado para células madre mesenquimatosas que comprende los componentes y sus respectivas cantidades en mg/l tal como se proporciona en la siguiente tabla:

Componente	Cantidad [mg/l]
Glicina	30
L-alanina	9

ES 2 660 898 T3

Monoclorhidrato de L-arginina	211
L-asparagina anhidra	50
Ácido L-aspártico	20
Diclorhidrato de L-cistina	62,6
Ácido L-glutámico	20
L-glutamina	584
Monoclorhidrato de L-histidina	42
L-Hidroxi-L-prolina	20
L-Isoleucina	105
L-Leucina	105
Monoclorhidrato de L-lisina	146
L-Metionina	30
L-Fenilalanina	66
L-Prolina	34,5
L-Serina	42
L-Treonina	95
L-Triptófano	16
Sal de disodio de L-tirosina dihidratada	103,79
L-Valina	94
Cloruro de calcio dihidratado	265
Sulfato cúprico pentahidratado	0,0025
Sulfato ferroso heptahidratado	0,834
Sulfato de magnesio anhidro	97,67
Cloruro de potasio	400
Cloruro de sodio	6400
Fosfato de sodio dibásico anhidro	142,04
Sulfato de zinc heptahidratado	0,863
Fosfato de ácido ascórbico	50
Cloruro de colina	13,96
D-Biotina	0,2
D-Pantotenato de Ca	4
Ácido fólico	4
Mio-inositol	35
Nicotinamida (amida de ácido nicotínico)	4
Ácido p-aminobenzoico (PABA)	1
Clorhidrato de piridoxal	4
Riboflavina	0,4
Clorhidrato de tiamina	4
Vitamina B12	1,36
D-Glucosa anhidra	4500
Hipoxantina	4,08

L-Glutati3n reducido	1
3cido linoleico	0,084
Sal de sodio de rojo de fenol	15,9
Putrescina+2HCl	0,161
Piruvato de sodio	110
3cido ti3ctico	0,21
Timidina	0,73

5 Seg3n un aspecto de la presente divulgaci3n, se proporciona a m3todo para crear un medio de cultivo b3sico para c3lulas madre mesenquimatosas, incluyendo el m3todo: preparar varias clases de candidatos a composici3n de medio de cultivo b3sico analizando la clase de componentes de medios de cultivo comercializados y luego combinar dos o m3s clases de medios de cultivo comercializados; y examinar una composici3n de medio de cultivo b3sico adecuada para el cultivo temprano de c3lulas madre mesenquimatosas analizando la tasa de crecimiento de c3lulas madre mesenquimatosas en un medio completo que contiene suero bovino fetal al 10-20% para los candidatos a composici3n de medio de cultivo b3sico.

10 Seg3n otro aspecto de la presente divulgaci3n, se proporciona un medio de cultivo b3sico para c3lulas madre mesenquimatosas, en el que se crea un medio b3sico avanzado de c3lulas madre mesenquimatosas (ABM-M) comparando un medio b3sico en el que se mezclan DMEM con alto contenido en glucosa, RPMI-1640 y F-12 de Ham, como medios comercializados, a una raz3n de 1:1:1, con DMEM con alto contenido en glucosa, RPMI-1640 y F-12 de Ham, respectivamente, y usando los componentes del DMEM con alto contenido en glucosa como componentes b3sicos, en el que los componentes que se solapan de los respectivos medios se seleccionan para que tengan concentraciones superiores, mientras que se permite que los componentes que se solapan est3n contenidos en el DMEM con alto contenido en glucosa si los compontes que se solapan no est3n contenidos en el DMEM con alto contenido en glucosa, en el que los componentes contenidos en s3lo uno de los medios respectivos se seleccionan para mantener las concentraciones de los mismos *per se*, mientras que se permite que los componentes est3n contenidos en el DMEM con alto contenido en glucosa si los componentes no est3n contenidos en el DMEM con alto contenido en glucosa, y en el que un componente seleccionado de los componentes correspondientes a la misma fuente de suministro entre los componentes de los respectivos medios se selecciona para que tenga una concentraci3n superior si el componente seleccionado es un componente que se solapa de los medios respectivos, mientras que se permite que el componente seleccionado est3 contenido en el DMEM con alto contenido en glucosa si los componentes solapantes no est3n contenidos en el DMEM con alto contenido en glucosa.

30 En el medio de cultivo b3sico para c3lulas madre mesenquimatosas, los componentes a3adidos al DMEM con alto contenido en glucosa pueden incluir: L-alanina, L-asparagina anhidra, 3cido L-asp3rtico, 3cido L-glut3mico, L-hidroxi-L-prolina y L-prolina en vista de amino3cidos; sulfato c3prico pentahidratado, sulfato ferroso heptahidratado, fosfato de sodio dib3sico anhidro y sulfato de zinc heptahidratado en vista de sales inorg3nicas; D-biotina, 3cido p-aminobenzoico (PABA) y vitamina B12 en vista de vitaminas; e hipoxantina, L-glutati3n reducido, 3cido linoleico, putrescina+2HCL, 3cido ti3ctico y timidina en vista de otros componentes.

35 En el medio de cultivo b3sico para c3lulas madre mesenquimatosas, el ABM-M puede incluir adem3s al menos uno de suero bovino, equino o humano fetal, L-glutamina, agentes antibi3ticos y agentes antif3ngicos.

40 En el medio de cultivo b3sico para c3lulas madre mesenquimatosas, el ABM-M puede incluir adem3s suero bovino fetal al 10-20% y L-glutamina 2-4 mM.

45 En el medio de cultivo b3sico para c3lulas madre mesenquimatosas, el componente seleccionado de los componentes correspondientes a la misma fuente de suministro pueden incluir: monoclorhidrato de L-arginina, 3cido L-asp3rtico, diclorhidrato de L-cistina y monoclorhidrato de L-histidina monohidratado en vista de amino3cidos; cloruro de calcio deshidratado, sulfato ferroso heptahidratado, sulfato de magnesio anhidro y fosfato de sodio dib3sico anhidro en vista de sales inorg3nicas; y clorhidrato de piridoxal en vista de vitaminas.

50 En el medio de cultivo b3sico para c3lulas madre mesenquimatosas, el ABM-M puede expresar los marcadores de superficie positivos CD166, CD105, CD90, CD44, CD29, CD73 y HLA-ABC al 80% o m3s, especialmente los marcadores de superficie positivos CD44, CD105, CD90, CD73 y CD166 al 95% o m3s, y los marcadores de superficie negativos CD14, CD31, CD34, CD45, CD80 y HLA-DR al 5% o menos.

Seg3n todav3a otro aspecto de la presente divulgaci3n, se proporciona un agente terap3utico celular para tratar defectos 3seos, en el que se cultivan c3lulas madre mesenquimatosas en el medio b3sico avanzado para c3lulas madre mesenquimatosas (ABM-M), y luego se cultivan de nuevo y se diferencian en  $\alpha$ -MEM que contiene suero

bovino fetal, dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato y ácido ascórbico, conduciendo a la diferenciación en osteoblastos.

5 Según todavía otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un agente terapéutico celular para tratar osteoartritis, en el que se cultivan células madre mesenquimatosas en el medio básico avanzado para células madre mesenquimatosas (ABM-M), y luego se cultivan de nuevo y se diferencian en  $\alpha$ -MEM que contiene dexametasona, ácido ascórbico, piruvato de sodio, TGF- $\beta$  y BMP-2, conduciendo a la diferenciación en condrocitos.

10 Según todavía otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un agente terapéutico celular para formar adipocitos, en el que se cultivan células madre mesenquimatosas en el medio básico avanzado para células madre mesenquimatosas (ABM-M), y luego se cultivan de nuevo y se diferencian en  $\alpha$ -MEM que contiene suero bovino fetal, dexametasona, indometacina e insulina, conduciendo a diferenciación.

#### Efectos ventajosos

15 Las células madre mesenquimatosas indiferenciadas, que son células madre adultas humanas, pueden producirse en masa y cultivarse a una alta tasa de crecimiento mediante el medio de cultivo básico anterior para células madre mesenquimatosas de la presente invención; el cariotipo de las células puede mantenerse a pesar del cultivo y la proliferación durante un periodo de tiempo prolongado de un mes o más; y las células madre mesenquimatosas pueden usarse como agente terapéutico celular a través de diferenciación en derivados de osteoblastos, condrocitos y adipocitos.

#### **Breve descripción de los dibujos**

25 La figura 1 muestra un gráfico que ilustra el crecimiento de células madre mesenquimatosas, tras inocularse células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea a 375.000 células en medios que contienen MSC-BM, como grupo de control, más aditivos y suero bovino fetal al 10%, y medios que contienen ABM-M de la presente invención más aditivos y suero bovino fetal al 10% en frascos T75, seguido por cultivo durante 10 días.

30 La figura 2 muestra un gráfico que ilustra el crecimiento de células madre mesenquimatosas, tras inocularse células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo a 375.000 células en ADSCGM como grupo de control y el medio que contiene ABM-M de la presente invención más suero bovino fetal al 10% en frascos T75, seguido por cultivo durante 7 días, y las células madre mesenquimatosas se hacen crecer y se subcultivan, y luego se inoculan a 875.000 células en frascos T175, seguido por cultivo durante 7 días.

35 La figura 3 muestra un gráfico que ilustra la tasa de crecimiento de células madre mesenquimatosas haciendo crecer células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en medios que contienen MSC-BM, como grupo de control, más aditivos y suero bovino fetal al 10%, y medios que contienen ABM-M de la presente invención más aditivos y suero bovino fetal al 10%

40 La figura 4 muestra un gráfico que ilustra la tasa de crecimiento de células madre mesenquimatosas para cada pase haciendo crecer células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en ADSCGM como grupo de control y el medio que contiene ABM-M de la presente invención más suero bovino fetal al 10%.

45 La figura 5 muestra gráficos que ilustran cambios en el tamaño y fenotipo de las células realizando citometría de flujo sobre células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea o tejido adiposo cultivadas MSCGM o ADSCGM como grupo de control y células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo o médula ósea cultivadas en medios que contienen ABM-M de la presente invención más suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM (SS; contenido granular dentro de la célula, FS; tamaño celular).

50 La figura 6 muestra histogramas que ilustran características inmunológicas celulares de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea cultivadas en medios que contienen ABM-M de la presente invención más suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM.

55 La figura 7 muestra histogramas que ilustran características inmunológicas celulares de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo cultivadas en medios que contienen ABM-M de la presente invención más suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM.

60 La figura 8 muestra imágenes de tinción con ALPase y von Kossa tras cultivarse células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo y médula ósea en medios que contienen ABM-M de la presente invención más suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM, y luego cultivarse de nuevo y diferenciarse en medios de cultivo para la diferenciación de osteoblastos ( $\alpha$ -MEM que contiene suero bovino fetal al 10%,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM, ácido ascórbico 50  $\mu$ M y dexametasona  $10^{-7}$  M) durante 2-3 semanas.

65 La figura 9 muestra imágenes de tinción con aceite rojo-O tras cultivarse células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo y médula ósea en medios que contienen ABM-M de la presente invención más suero bovino fetal al

10% y L-glutamina 2 mM, y luego volverse a cultivar y diferenciarse en medios para la diferenciación de adipocitos ( $\alpha$ -MEM que contiene suero bovino fetal al 10%, dexametasona  $10^{-7}$  M, indometacina 100  $\mu$ M e insulina 10  $\mu$ g/ml) durante 2 semanas.

5 La figura 10 muestra imágenes de tinción con H/E, tinción con safranina O, tinción con azul alcian, tinción con rojo sirio, tinción con COMP y tinción de colágeno tipo II y I de secciones en serie de 5  $\mu$ m de tejido de cartílago a través de un procedimiento de incrustación en parafina, obteniéndose el tejido de cartílago cultivando células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea cultivadas en medios que contienen ABM-M de la presente invención más suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM, y luego, con el fin de inducir la diferenciación en condrocitos, 10 centrifugando aproximadamente 300 g de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células durante 5 minutos para preparar una masa celular y volviendo a cultivar y diferenciando las células madre mesenquimatosas cultivadas en medios DMEM con alto contenido en glucosa que contienen dexametasona  $10^{-7}$  M, ácido ascórbico 50  $\mu$ M, piruvato de sodio 1 nM, TGF- $\beta$  10 ng/ml y BMP-2 100 ng/ml durante 3 semanas.

15 La figura 11 muestra imágenes de análisis de cariotipo tras 10 pases en cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea cultivadas en medios que contienen ABM-M de la presente invención más suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM.

20 La figura 12 muestra imágenes de análisis de cariotipo tras 10 pases en cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo cultivadas en medios que contienen ABM-M de la presente invención más suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM.

La figura 13 muestra una imagen que ilustra la anomalía morfológica y la pérdida de adhesividad en células madre mesenquimatosas mientras se cultivan células madre mesenquimatosas en ABM-C convencional.

25

### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

La presente invención proporciona un medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas, y el medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas se crea incluyendo las etapas de: preparar varias clases de 30 candidatos a composición de medio de cultivo básico analizando la clase de componentes de medios de cultivo comercializados y luego combinando dos o más clases de medios de cultivo comercializados; y examinando una composición de medio de cultivo básico adecuada para el cultivo temprano de células madre mesenquimatosas analizando la tasa de crecimiento de células madre mesenquimatosas en un medio completo que contiene suero bovino fetal al 10-20% para los candidatos a composición de medio de cultivo básico.

35

El medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas así creado de la presente invención se usa para analizar si las células madre mesenquimatosas cultivadas tempranamente a una alta tasa de crecimiento presentan características inmunológicas celulares, analizar la capacidad de diferenciación de si las células madre mesenquimatosas se diferencian en osteoblastos, condrocitos y adipocitos, y analizar el cariotipo celular con el fin 40 de confirmar si las células madre mesenquimatosas pueden cultivarse durante un tiempo prolongado sin provocar ninguna mutación debido a anomalía cromosómica, verificando por ello si las células madre mesenquimatosas pueden usarse como agente terapéutico para tratar defectos óseos, tratar osteoartritis y tratar adipocitos a través de formación de tejido adiposo.

45 En este caso, es necesario analizar las características inmunológicas celulares, la capacidad de diferenciación y el cariotipo celular para verificar si el medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas de la presente invención puede usarse para un agente terapéutico celular, y es preferible realizar la verificación a través de experimentos en el siguiente orden. La verificación se realiza mediante: una etapa de analizar las características celulares inmunológicas celulares de células madre mesenquimatosas cultivadas en la composición de medio 50 examinada; una etapa de analizar la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimatosas cultivadas en la composición de medio examinada; y una etapa de analizar el cariotipo celular para verificar si las células madre mesenquimatosas cultivadas en la composición de medio examinada pueden cultivarse durante un tiempo prolongado.

55 A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle.

Se crea un medio básico avanzado para células madre mesenquimatosas (ABM-M), que es el medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas de la presente invención, preparando un medio básico en el que se mezclan DMEM con alto contenido en glucosa, RPMI-1640 y F-12 de Ham, que son medios de cultivo 60 comercializados, a una razón de 1:1:1, y usando los componentes del DMEM con alto contenido en glucosa como componentes básicos. En este caso, el medio básico se compara con los respectivos medios, DMEM con alto contenido en glucosa, RPMI-1640 y F-12 de Ham. En el presente documento, el componente que se solapa de los medios respectivos se selecciona para que tenga una concentración superior, mientras que el componente que se solapa se permite que esté contenido en el DMEM con alto contenido en glucosa a través de una adición del mismo si el componente que se solapa no está contenido en el DMEM con alto contenido en glucosa (① en las columnas 65 de comentario de la tabla 1); el componente contenido en sólo uno de los respectivos medios se selecciona para

mantener la concentración del mismo *per se*, mientras que se permite que el componente esté contenido en el medio DMEM con alto contenido en glucosa a través de una adición del mismo si el componente no está contenido en el DMEM con alto contenido en glucosa (② en las columnas de comentario de la tabla 1); y un componente seleccionado del componente correspondiente a la misma fuente de suministro entre los componentes de los respectivos medios se selecciona para tener una concentración superior si el componente seleccionado es un componente que se solapa de los respectivos medios, mientras que se permite que el componente seleccionado esté contenido en los medios DMEM con alto contenido en glucosa a través de una adición del mismo si el componente seleccionado no está contenido en el DMEM con alto contenido en glucosa (③ en las columnas de comentario de la tabla 1). Por tanto, se crea el medio tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Composiciones de medios comercializados y ABM-M						
Componentes (mg/l)		DMEM	RPMI	F-12	ABM-M	COMENTARIO
<i>Aminoácidos</i>						
	Glicina	30	10	7,51	30	①
	L-Alanina			9	9	②, contenido
	Base libre de L-arginina		200			③
	Monoclorhidrato de L-arginina	84		211	211	
	L-Asparagina anhidra		50		50	③, contenido
	L-Asparagina monohidratada			15,01		
	Ácido L-aspártico		20	13,3	20	①, contenido
	Monoclorhidrato de L-cisteína monohidratado			35		③
	Diclorhidrato de L-cistina	62,6	65,2		62,6	
	Ácido L-glutámico		20	14,7	20	①, contenido
	L-Glutamina	584	300	146	584	①
	L-Histidina		151			③
	Monoclorhidrato de L-histidina	42		20,96	42	
	L-Hidroxi-L-prolina		20		20	②, 포함
	L-Isoleucina	105	50	3,94	105	①
	L-Leucina	105	50	13,1	1050	①
	Monoclorhidrato de L-lisina	146	40	36,5	146	①
	L-Metionina	30	15	4,48	30	①
	L-Fenilalanina	66	15	4,96	66	①
	L-Prolina		20	34,5	34,5	①, contenido
	L-Serina	42	30	10,5	42	①
	L-Treonina	95	20	11,9	95	①
	L-Triptófano	16	5	2,04	16	①
	Sal de sodio de L-tirosina dihidratada	103,79	28,83	7,78	103,79	①
	L-Valina	94	20	11,7	94	①
<i>Sales inorgánicas</i>						
	Cloruro de calcio dihidratado	265		44,1	265	③
	Nitrato de calcio tetrahidratado		100			
	Sulfato cúprico pentahidratado			0,0025	0,0025	②, contenido
	Nitrato férrico nonahidratado	0,1				③, contenido
	Sulfato ferroso heptahidratado			0,834	0,834	

	Cloruro de magnesio hexahidratado			123		③
	Sulfato de magnesio anhidro	97,67	48,84		97,67	
	Cloruro de potasio	400	400	224	400	①
	Cloruro de sodio	6.400	5.300	7.599	6.400	①
	Fosfato de sodio dibásico anhidro		800	142,04	142,04	③, contenido
	Fosfato de sodio monobásico anhidro	109				
	Sulfato de zinc heptahidratado			0,863	0,863	②, contenido
Componentes (mg/l)		DMEM	RPMI	F-12	ABM-M	COMENTARIO
<i>Vitaminas</i>						
	Fosfato de ácido ascórbico	50	50	500	50	①
	Cloruro de colina	4	3	13,96	13,96	①
	D-Biotina		0,2	0,0073	0,2	①, contenido
	D-Pantotenato de Ca	4	0,25	0,48	4	①
	Ácido fólico	4	1	1,32	4	①
	Mio-inositol	7,2	35	18	35	①
	Nicotinamida (amida de ácido nicotínico)	4	1	0,037	4	①
	Ácido p-aminobenzoico (PABA)		1		1	②, contenido
	Clorhidrato de piridoxal	4			4	③
	Clorhidrato de piridoxina		1	0,062		
	Riboflavina	0,4	0,2	0,038	0,4	①
	Clorhidrato de tiamina	4	1	0,34	4	①
	Vitamina B12		0,005	1,36	1,36	①, contenido
<i>Otros componentes</i>						
	D-Glucosa anhidra	4.500	2.000	1.802	4.500	①
	Hipoxantina			4,08	4,08	②, contenido
	L-Glutatión reducido		1		1	②, contenido
	Ácido linoleico			0,084	0,084	②, contenido
	Sal de sodio de rojo de fenol	15,9	5,3	1,3	15,9	①
	Putrescina+2HCL			0,161	0,161	②, contenido
	Piruvato de sodio	110		110	110	①
	Ácido tióctico			0,21	0,21	②, contenido
	Timidina			0,73	0,73	②, contenido

5 Tal como se muestra en las columnas de comentario de la tabla 1, los componentes que están ausentes en el DMEM con alto contenido en glucosa, que es la base de ABM-M de la presente invención, y por tanto se permite que estén contenidos en el DMEM con alto contenido en glucosa a través de una adición son L-alanina (9-18 mg/l), L-asparagina anhidra (1-50 mg/l), ácido L-aspartico (13,3-20 mg/l), ácido L-glutámico (14,7-20 mg/l), L-hidroxi-L-prolina (1-20 mg/l) y L-prolina (20-34,5 mg/l) en vista de aminoácidos; sulfato cúprico pentahidratado (0,001-0,0025 mg/l), sulfato ferroso heptahidratado (0,4-0,834 mg/l), fosfato de sodio dibásico anhidro (109-800 mg/l) y sulfato de zinc heptahidratado (0,1-0,863 mg/l) en vista de sales inorgánicas; D-biotina (0,0073-0,2 mg/l), ácido p-aminobenzoico (PABA, 0,1-1 mg/l) y vitamina B12 (0,005-1,36 mg/l) en vista de vitaminas; e hipoxantina (1-4,08 mg/l), L-glutatión reducido (0,1-1 mg/l), ácido linoleico (0,01-0,084 mg/l), putrescina+2HCL (0,1-0,161 mg/l), ácido tióctico (0,1-0,21 mg/l) y timidina (0,35-0,73 mg/l) en vista de los otros componentes.

10 Las columnas de comentario de la tabla 1 con respecto al medio básico avanzado para células madre mesenquimatosas (ABM-M), que es el medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas de la presente

invención, se describirán tal como sigue.

(1) El componente que se solapa de los respectivos medios se selecciona para que tenga una concentración superior, y si el componente que se solapa no está contenido en el DMEM con alto contenido en glucosa, se permite que el componente que se solapa esté contenido en el medio DMEM con alto contenido en glucosa a través de una adición del mismo. Esto corresponde a ① en las columnas de comentario de la tabla 1.

Con respecto a esta característica, como resultado de cultivar células madre mesenquimatosas derivadas de células madre adultas de la presente divulgación en el ABM-C, que se compone de DMEM y RPMI-1640, del documento patente 9 según la técnica convencional, se provocaron anomalía morfológica y pérdida de adhesividad, y con el fin de compensar esto, se complementaron los componentes relevantes para la tasa de crecimiento y la síntesis de células.

En cuanto a los aminoácidos, se seleccionaron glicina, L-glutamina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina, que son aminoácidos principales de la síntesis de proteínas, para que tuvieran concentraciones superiores, promoviendo por ello la síntesis de proteínas y aumentando la proliferación de células.

En cuanto a las sales inorgánicas, se seleccionaron cloruro de potasio y cloruro de sodio, que son relevantes para las presiones osmóticas intracelular y extracelular, para que tuvieran concentraciones superiores con el fin de mantener presiones osmóticas adecuadas.

En cuanto a las vitaminas, se seleccionaron fosfato de ácido ascórbico, cloruro de colina, D-biotina (que se permitió que estuvieran contenidos en DMEM con alto contenido en glucosa), D-pantotenato de Ca, ácido fólico, mio-inositol, nicotinamida, riboflavina, clorhidrato de tiamina y vitamina B12 (que se permitió que estuvieran contenidos en DMEM con alto contenido en glucosa), que son antioxidantes, para que tuvieran concentraciones superiores con el fin de eliminar residuos generados debido a la alta proliferación de células.

En cuanto a los otros componentes, se seleccionó D-glucosa anhidra, que es una fuente de energía principal, para que tuviera una concentración superior con el fin de mantener una alta proliferación, y se seleccionó piruvato de sodio, que participa en la síntesis intracelular, para que tuviera una concentración superior. Además, la sal de sodio de rojo de fenol no es relevante para la proliferación de células, pero el color del rojo de fenol cambia de rojo a amarillo por los residuos excretados debido a la proliferación activa de células, y por tanto se seleccionó la sal de sodio de rojo de fenol para que tuviera una concentración superior con el fin de medir visualmente la cantidad de los residuos excretados debido a una alta tasa de crecimiento de células.

Además, la prolina es un componente principal del colágeno, y un componente principal de la síntesis de sustratos extracelulares. Se permitió que la prolina estuviera contenida en el DMEM con alto contenido en glucosa con el fin de aumentar la síntesis de colágeno en células madre mesenquimatosas con alta proliferación.

Además, está contenido ácido aspártico en la mayoría de las proteínas, y está relacionado con el ciclo del ácido cítrico sirviendo como fuente de suministro de grupos amino de bases de purina y pirimidina. Por tanto, las bases de purina y pirimidina son fuentes de suministro principales de la síntesis de ADN de células que muestran alta proliferación, y se permitió que las bases de purina y pirimidina como fuentes de suministro principales estuvieran contenidas en DMEM con alto contenido en glucosa.

Además, se permitió que ácido L-glutámico, que es un aminoácido importante en el metabolismo celular, estuviera contenido en el DMEM con alto contenido en glucosa con el fin de lograr la proliferación activa de células.

(2) El componente contenido en sólo uno de los respectivos medios se selecciona para mantener la concentración del mismo *per se*, y si el componente no está contenido en el DMEM con alto contenido en glucosa, se permite que el componente esté contenido en el medio DMEM con alto contenido en glucosa a través de una adición del mismo. Esto corresponde a ② en las columnas de comentario de la tabla 1.

Las células madre mesenquimatosas en el ABM-C, que se compone de DMEM y RPMI-1640 para aumentar la tasa de crecimiento, perdieron la adhesividad celular de las mismas. Con el fin de compensar esto, se permitió que los componentes ausentes en el DMEM con alto contenido en glucosa estuvieran contenidos en DMEM con alto contenido en glucosa con el fin de aumentar la síntesis de colágeno intracelular y eliminar residuos provocados debido al aumento de la síntesis.

Se permitió que L-alanina como aminoácido, que participa en la inmunidad y síntesis de células, estuviera contenido con el fin de aumentar la proliferación de células madre mesenquimatosas. Se permitió que L-hidroxi-L-prolina como aminoácido, ácido tióctico y ácido linoleico como otros componentes y ácido p-aminobenzoico (PABA) como vitamina, que son constituyentes del colágeno intracelular, estuvieran contenidos en el DMEM con alto contenido en glucosa con el fin de aumentar la síntesis de colágeno intracelular para potenciar la adhesividad celular.

Se permitió que sulfato cúprico pentahidratado y sulfato de zinc heptahidratado como sales inorgánicas y glutatión reducido como otro componente, que son antioxidantes, estuvieran contenidos en el DMEM con alto contenido en glucosa con el fin de aumentar adicionalmente la excreción de diversos residuos en células que muestran una alta tasa de crecimiento para presentar una alta tasa de crecimiento celular.

5 Se permitió que timidina, putrescina+2HCL e hipoxantina como otros componentes, que participan en la síntesis de ADN, estuvieran contenidos en el DMEM con alto contenido en glucosa puesto que es necesario que la síntesis de ADN prevalezca con el fin de aumentar la proliferación celular.

10 (3) Entre los componentes de los respectivos medios, se selecciona un componente seleccionado de componentes correspondientes a las mismas fuentes de suministro para que tenga una concentración superior si el componente seleccionado es un componente que se solapa, y se permitió que el componente seleccionado estuviera contenido en el DMEM con alto contenido en glucosa a través de una adición del mismo si el componente seleccionado no está contenido en el DMEM con alto contenido en glucosa. Esto corresponde a ③ en las columnas de comentario de la tabla 1.

15 Con respecto a L-arginina, L-asparagina, L-cisteína/cistina y L-histidina, como aminoácidos; nitrato/cloruro de calcio, nitrato férrico/sulfato ferroso y fosfato de sodio, como sales inorgánicas; y clorhidrato de piridoxal/clorhidrato de piridoxina como vitaminas, la adición de dos o más componentes de los mismos correspondientes a la misma fuente de suministro aumenta la presión osmótica en los medios, teniendo una mala influencia sobre las células, y por tanto, de los componentes correspondientes a la misma fuente de suministro, sólo se seleccionó un componente con una concentración superior.

20 Además de los componentes de sales inorgánicas, se seleccionaron componentes con menos hidratos con el fin de minimizar las sales que pueden generarse en el momento de la preparación de los medios.

25 Excepcionalmente, se seleccionó fosfato de sodio para que tuviera una concentración de 142,04 mg/l con el fin de mantener una presión osmótica adecuada puesto que el fosfato de sodio con una concentración superior puede aumentar la presión osmótica total en el medio, dando como resultado una mala influencia sobre las células.

30 Cloruro de magnesio hexahidratado y sulfato de magnesio anhidro son fuentes de suministro de magnesio, que es un material principal del metabolismo intracelular. Con el fin de reducir la generación de sales en el momento de la preparación de los medios, se seleccionó sulfato de magnesio anhidro, y se seleccionó una concentración superior del mismo puesto que el sulfato de magnesio anhidro es un componente que se solapa.

35 Por los motivos anteriores, en cuanto a los aminoácidos, se selecciona monoclóridato de L-arginina (211 mg/l) entre base libre de L-arginina (RPMI) y monoclóridato de L-arginina (DMEM y F12); se selecciona diclorhidrato de L-cistina (62,6 mg/l) entre monoclóridato de L-cisteína monohidratado y diclorhidrato de L-cistina; y se selecciona monoclóridato de L-histidina monohidratado (42 mg/l) entre L-histidina y monoclóridato de L-histidina monohidratado, tal como se muestra en la tabla 1. En cuanto a las sales inorgánicas, se selecciona cloruro de calcio deshidratado (265 mg/l) a partir de cloruro de calcio deshidratado y nitrato de calcio tetrahidratado; se selecciona sulfato ferroso heptahidratado (0,834 mg/l) entre nitrato férrico noahidratado y sulfato ferroso heptahidratado; se selecciona sulfato de magnesio anhidro (97,67 mg/l) entre cloruro de magnesio hexahidratado y sulfato de magnesio anhidro; y se selecciona fosfato de sodio dibásico anhidro (142,04 mg/l) entre fosfato de sodio dibásico anhidro y fosfato de sodio monobásico anhidro.

45 En cuanto a las vitaminas, se selecciona clorhidrato de piridoxal (4 mg/l) entre clorhidrato de piridoxal y clorhidrato de piridoxina.

50 Tal como se describió anteriormente, la composición del medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas (medio básico avanzado para células madre mesenquimatosas, ABM-M) para cultivar *in vitro* células madre mesenquimatosas derivadas de células adultas, tales como médula ósea y grasa, comienza a partir de las composiciones de DMEM con alto contenido en glucosa, RPMI-1640 y F-12 de Ham, y en este caso, los componentes del DMEM con alto contenido en glucosa se usan como componentes básicos.

55 Es decir, puesto que las células madre mesenquimatosas se derivan de células madre adultas en las que la proliferación y síntesis son inactivas, el ABM-M de la presente invención es un medio en el que los componentes del DMEM con alto contenido en glucosa con altas concentraciones de aminoácidos se usan como componentes básicos y las concentraciones de aminoácidos, sales inorgánicas y vitaminas, que están ausentes o reducidas en el DMEM con alto contenido en glucosa, se ajustan.

60 El término células madre mesenquimatosas se refiere células indiferenciadas que se derivan de tejidos adultos de mamíferos incluyendo seres humanos y que tienen multipotencia, y los tejidos adultos incluyen médula ósea, sangre, cerebro, piel, grasa, sangre del cordón umbilical, y similares.

65 Las células madre mesenquimatosas pueden aislarse del tejido adulto, tal como médula ósea o tejido adiposo, a

través de diversos métodos. Por ejemplo, las células madre mesenquimatosas pueden aislarse usando centrifugación en gradiente de densidad de Percoll *et al.*, (Majumdar MK *et al.*, J. Cell Physiol. 176:57, 1998; Majka SM *et al.*, J. Clin. Invest., 111:71, 2003), o en cuanto a las células aisladas mediante tratamiento con una enzima, tal como colagenasa, todas las células que se adhieren a y que crecen sobre el fondo en un recipiente de cultivo pueden aislarse fácilmente mediante el método de Luria, *et al.*, (Luria *et al.*, Transfusion, 11:345, 1971).

El medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas de la presente invención es para cultivar células madre mesenquimatosas aisladas de tejidos adultos, tales como médula ósea, sangre, cerebro, piel, grasa y sangre del cordón umbilical. En casos de necesidad, pueden añadirse uno o más componentes al mismo, y pueden añadirse agentes antibióticos y agentes antifúngicos para prevenir la contaminación microbiana así como suero bovino, equino o humano fetal y L-glutamina. Preferiblemente, se añaden suero bovino fetal al 10-20% y L-glutamina 2-4 mM.

Con el fin de verificar la tasa de crecimiento a través del medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas (ABM-M), las células madre mesenquimatosas se cultivan en el medio de cultivo básico de la presente invención. Con respecto a las características inmunológicas celulares de las células madre mesenquimatosas así cultivadas, las células madre mesenquimatosas presentan características inmunológicas celulares de manera que los marcadores de superficie positivos CD166, CD105, CD90, CD44, CD29, CD73 y HLA-ABC se expresan al 80% o más, y particularmente, los marcadores de superficie positivos CD44, CD105, CD90, CD73 y CD166 se expresan al 95% o más, y los marcadores de superficie negativos CD31, CD34, CD45, CD80 y HLA-DR se expresan al 5% o menos.

Además, las células madre mesenquimatosas así cultivadas presentan una morfología de forma de huso al adherirse y proliferar sobre un recipiente de cultivo de plástico, y tienen capacidad de diferenciación de proliferación en un estado de desdiferenciación.

Además, pudo verificarse que las células madre mesenquimatosas cultivadas son células madre mesenquimatosas multipotentes que pueden diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos.

Además, la presente divulgación proporciona un agente terapéutico celular para tratar defectos óseos, que contiene células madre mesenquimatosas que se cultivan en medio básico avanzado para células madre mesenquimatosas (ABM-M) y se cultivan de nuevo en  $\alpha$ -MEM que contiene suero bovino fetal, dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato y ácido ascórbico, permitiendo por ello la diferenciación en osteoblastos.

Además, la presente divulgación proporciona un agente terapéutico celular para tratar osteoartritis, que contiene células madre mesenquimatosas que se cultivan en medio básico avanzado para células madre mesenquimatosas (ABM-M) y se cultivan de nuevo en DMEM con bajo contenido en glucosa que contiene dexametasona, ácido ascórbico, piruvato de sodio, TGF- $\beta$  y BMP-2, permitiendo por ello la diferenciación en condrocitos.

Además, la presente divulgación proporciona un agente terapéutico celular para formar tejido adiposo, que contiene células madre mesenquimatosas que se cultivan en medio básico avanzado para células madre mesenquimatosas (ABM-M) y se cultivan de nuevo en  $\alpha$ -MEM que contiene suero bovino fetal, dexametasona, indometacina e insulina, permitiendo por ello la diferenciación en adipocitos.

#### 45 MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

A continuación en el presente documento, se comparó la capacidad de proliferación de las células madre mesenquimatosas en el medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas (medio básico avanzado para células madre mesenquimatosas, ABM-M) de la presente invención con la de en otros medios, y la verificación de las características inmunológicas celulares de las células madre mesenquimatosas cultivadas en el ABM-M, la verificación de la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimatosas cultivadas en el ABM-M y el mantenimiento del cariotipo celular de las células madre mesenquimatosas cultivadas en el ABM-M se describirán en detalle a través de los ejemplos a continuación.

#### 55 Ejemplo 1

##### Comparación de la capacidad de proliferación en medio de cultivo básico para células madre mesenquimatosas (ABM-M) de la presente invención

60 Con el fin de analizar la capacidad de proliferación de células madre mesenquimatosas derivadas de tejidos adultos, tales como médula ósea y tejidos adiposos, en ABM-M, se adquirieron células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea y células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo congeladas de Lonza. Se cultivaron las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en Poietics MSCGM™ Bullekit, y se cultivaron las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en Poietics ADSC-GM™ Bullekit, y se compararon con  
65 medios exclusivos.

1-1. Preparación de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea y tejido adiposo

Se descongelaron inmediatamente células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea adquiridas de Lonza en un hervidor doble a 37°C, se colocaron en un tubo de 15 ml que contenía 5 ml de MSCGM™, y luego se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se dispensaron las células en 10 ml de MSCGM nuevo para medir el recuento celular y la viabilidad celular. Se inocularon las células preparadas en un frasco T25 a 5.000 células por cm<sup>2</sup>, y se cultivaron mientras se mantenían a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Se intercambió el líquido de cultivo por 5 ml de MSCGM para cada recipiente de cultivo cada 3-4 días, y cuando las células crecieron hasta el 90% o más del área del fondo del frasco, se realizó un subcultivo. Se realizaron cultivos segundo, tercero y cuarto para preparar agua celular para las pruebas.

Se descongelaron inmediatamente células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo adquiridas de Lonza en un hervidor doble a 37°C, se colocaron en un tubo de 15 ml que contenía 5 ml de ADSC-GM, y luego se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se dispensaron las células en 10 ml de ADSC-GM nuevo para medir el recuento celular y la viabilidad celular. Se inocularon las células preparadas en un frasco T25 a 5.000 células por cm<sup>2</sup>, y se cultivaron mientras se mantenían a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Se intercambió el líquido de cultivo por 5 ml de ADSC-GM para cada recipiente de cultivo cada 3-4 días, y cuando las células crecieron hasta el 90% o más del área del fondo del frasco, se realizó un subcultivo. Se realizaron subcultivos segundo, tercero y cuarto para preparar agua celular para las pruebas.

1-2. Comparación de la proliferación de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en ABM-M

Se investigó la capacidad de proliferación en el ABM-M de la presente invención usando las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea subcultivadas hasta cuatro pases en MSCGM, y, en este caso, se usó el MSCGM como control. Puesto que el MSCGM se compone de MSC-BM como medio básico y aditivos (incluyendo 50 ml de complemento de crecimiento, 10 ml de L-glutamina y 0,5 ml de penicilina-estreptomicina), también se añadieron los aditivos a ABM-M, y luego se realizó una prueba comparativa (tabla 2).

Tabla 2

Composición de medio para la capacidad de proliferación de ABM-M de la presente invención y MSCGM			
	Aditivos (Lonza)	Suero bovino fetal al 10%	L-Glutamina 2 mM
MSC-BM+FBS		○	○
MSC-BM+ aditivos	○		
ABM-M+FBS		○	○
ABM-M+ aditivos	○		

Tras el cuarto subcultivo, se inocularon las células a 5.000 células por cm<sup>2</sup> en un frasco T75 que contenía la composición de medio de la tabla 2, y se cultivaron mientras se mantenían a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Se cultivaron las células durante 10 días mientras se intercambiaba el líquido de cultivo por cada medio para cada recipiente de cultivo cada 3-4 días, y entonces se midió el recuento celular.

A través de las figuras 1 y 3, con respecto a los grupos de control, nunca se produjo proliferación en el medio (MSC-BM+FBS) que contenía MSC-BM complementado con suero bovino fetal al 10% durante 10 días, y tampoco se produjo apenas en el MSCGM, que es el MSC-BM complementado con aditivos.

Sin embargo, la proliferación fue superior en el medio (ABM-M+FBS) que contenía el ABM-M de la presente invención complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS), como grupo de prueba, en vez de MSCGM, y el tiempo de duplicación fue también más rápido en ABM-M+FBS en vez de MSCGM. La proliferación superior y el tiempo de duplicación más rápido se mostraron en el medio que contenía el ABM-M complementado con aditivos en vez de MSCGM, y por tanto se verificó que la composición del ABM-M aumentaba la tasa de crecimiento de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

Las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea no proliferaron en MSCGM, pero las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea proliferaron en ABM-M que contenía suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM. Esto indica que la capacidad de proliferación de las células madre mesenquimatosas cultivadas en MSCGM se perdió, pero la capacidad de proliferación de las mismas se mantuvo en ABM-M.

Con el fin de verificar el mantenimiento de la capacidad de proliferación en ABM-M, se inocularon las células recuperadas en el quinto subcultivo a 5.000 por cm<sup>2</sup> en un frasco T150, y se cultivaron mientras se mantenían a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Se cultivaron las células durante 10 días mientras se intercambiaba el líquido de cultivo con ABM-M que contenía suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM para cada recipiente de cultivo cada 3-4 días, y entonces se midió el recuento celular. Como resultado, se recuperaron 3.357.500 células, que mostraron una tasa

de crecimiento del 447% en comparación con las 750.000 células inoculadas, y por tanto se verificó que la capacidad de proliferación se mantuvo. Por tanto, se verificó que el ABM-M de la presente invención permitía una excelente capacidad de proliferación de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

5 Tabla 3

Resultados de análisis de proliferación de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea para cada medio de cultivo					
		Número de células inoculadas	Número de células que se adhieren el 1 <sup>er</sup> día de cultivo	Número de células recuperadas el 10 <sup>o</sup> día de cultivo	Tiempo de duplicación (días)
Grupo de control	MSC-BM+FBS	375.000	285.000	289.335	413,16
	MSC-BM+aditivos	375.000	378.750	457.665	32,95
Grupo de prueba	ABM+FBS	375.000	360.000	983.500	6,21
	ABM+aditivos	375.000	378.750	701.000	10,13

1-3. Comparación de la proliferación de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en ABM-M

10 Se investigó la capacidad de proliferación en el ABM-M de la presente invención usando las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo que se subcultivaron hasta cuatro pases en ADSC-GM, y en este caso, se usó ADSC-GM como control. Puesto que ADSC-GM se compone de ADSCC-BM como medio básico y aditivos (incluyendo 50 ml de suero bovino fetal, 5 ml de L-glutamina, 0,5 ml de gentamicina-anfotericina), también se añadieron suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM a ABM-M de la presente invención, y luego se realizó una prueba comparativa. Tras el cuarto subcultivo, se inocularon las células a 5.000 células por cm<sup>2</sup> en un frasco T75 que contenía cada medio, y se cultivaron mientras se mantenían a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Se cultivaron las células durante 7 días mientras se intercambiaba el líquido de cultivo por cada medio para cada recipiente de cultivo cada 3-4 días, y entonces se midió el recuento celular. Además, se subcultivaron las células recuperadas, y luego se inocularon a 5.000 células por cm<sup>2</sup> en un frasco T175 que contenía cada medio, y se cultivaron mientras se mantenían a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Se cultivaron las células durante 7 días mientras se intercambiaba el líquido de cultivo por cada medio para cada recipiente de cultivo cada 3-4 días, y entonces se midió el recuento celular.

25 A través de las figuras 2 y 4 y la tabla 5, el tiempo de duplicación en el subcultivo quinto y sexto era más rápido en ABM-M complementado con suero bovino fetal al 10% (ABM-M+FBS) como grupo de prueba en vez de ADSC-GM como control, y las células recuperadas están más en ABM-M+FBS en vez de ADSC-GM. Por tanto, se verificó que la capacidad de proliferación de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo aumentó en ABM-M de la presente invención (tabla 4).

Tabla 4

Resultados de análisis de la proliferación de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo para cada medio de cultivo				
	ADSC-GM		ABM-M+FBS	
	Pase 5	Pase 6	Pase 5	Pase 6
Número de células inoculadas		875.000	375.000	875.000
Número de células que se adhieren el 1 <sup>er</sup> día de cultivo	373.125	761.250	390.000	843.750
Número de células recuperadas el 7 <sup>o</sup> día de cultivo	935.500	2.219.000	1.161.000	4.443.500
Tiempo de duplicación (días)	4,5	3,9	3,8	2,5

30 Ejemplo 2

Análisis de las características inmunológicas de células madre mesenquimatosas cultivadas en ABM-M de la presente invención

35 Se aislaron las células cultivadas en los medios de cultivo de 1-2 y 1-3 del ejemplo 1 mediante el tratamiento con TrypLE express, y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos, obteniendo por ello células. Entonces, se lavaron las células dos veces con disolución de FACS, y se dispensaron las células lavadas a 5 10<sup>5</sup>, y se hicieron reaccionar con anticuerpos anti-CD166, CD105, CD90, CD44, CD29, CD73, HLA-ABC, CD31, CD34, CD45, CD80 y HLA-DR durante 20 minutos, seguido por lavado, y luego se permitió que flotar en disolución de FACS, seguido por análisis de citometría de flujo. Se analizó la superficie celular para identificar el fenotipo de las células madre mesenquimatosas.

5 Como resultado, como las células madre mesenquimatosas cultivadas en MSC-GM y ADSC-GM como grupos de control, las células cultivadas en ABM-M que contenía suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM mostraron expresión positiva de CD166, CD105, CD90, CD44, CD29, CD73 y HLA-ABC y expresión negativa de CD14, CD31, CD34, CD45, CD80 y HLA-DR, y por tanto se verificó que las células cultivadas tienen características de células madre mesenquimatosas (tabla 5).

Tabla 5

Características inmunológicas de células madre mesenquimatosas cultivadas en ABM-M				
	Células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea		Células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo	
	MSC-GM	ABM-M	ADSC-GM	ABM-M
CD29	76,6%	83,2%	88,7%	97,7%
CD44	95,2%	98,0%	99,9%	100%
CD73	N/A	N/A	98,7%	98,5%
CD90	91,86%	93,25%	97,4%	98,0%
CD105	99,6%	98,6%	99,9%	100%
CD166	99,5%	99,5%	100%	99,9%
HLA-ABC	76,7%	82,2%	83,8%	92,1%
CD80	0,0%	0,1%	0,2%	0,1%
CD45	3,9%	9,12%	0,2%	3,0%
CD34	0,2%	0,1%	5,2%	14,6%
CD31	0,1%	1,9%	0,1%	0,6%
CD14	0,2%	0,09%	0,8%	3,0%
HLA-DR	0,1%	0,0%	0,1%	0,1%

10 Ejemplo 3

Análisis de la capacidad de diferenciación de células madre mesenquimatosas cultivadas en ABM-M

15 Se aislaron las células cultivadas en los medios de cultivo de 1-2 y 1-3 del ejemplo 1 mediante el tratamiento con triplex, y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos, obteniendo por ello células. Entonces, se verificó la multipotencia de las células obtenidas en condiciones *in vitro*.

20 Con el fin de verificar la multipotencia de las células madre mesenquimatosas cultivadas, se indujo diferenciación mediante el método de Schallmoser K, *et al.*, (Schallmoser K. *et al.*, Tissue Eng Par C Method 14:185, 2008) tal como sigue.

25 En cuanto a la diferenciación en osteoblastos, tras cultivarse tempranamente las células madre mesenquimatosas en ABM-M, se cultivaron de nuevo y se diferenciaron en  $\alpha$ -MEM que contenía suero bovino fetal al 10%,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM, ácido ascórbico 50  $\mu$ M y dexametasona  $10^{-7}$  M durante 2-3 semanas, se sometió a ensayo la expresión de fosfatasa alcalina mediante tinción con ALPase, y se confirmó la acumulación de calcio mediante tinción de von Kossa, tal como se muestra en la figura 8.

30 En cuanto a la diferenciación en adipocitos, tras cultivarse tempranamente las células madre mesenquimatosas en ABM-M, se cultivaron de nuevo y se diferenciaron en  $\alpha$ -MEM que contenía suero bovino fetal al 10%, dexametasona  $10^{-7}$  M, indometacina 100  $\mu$ M e insulina 10  $\mu$ g/ml durante 2 semanas, se confirmaron las gotitas adiposas acumuladas en las células a través de tinción con aceite rojo-O.

35 Con el fin de inducir la diferenciación en condrocitos, se centrifugaron aproximadamente  $5 \times 10^5$  células madre mesenquimatosas cultivadas tempranamente en ABM-M a 300 g durante 5 minutos para preparar una masa celular, y luego se cultivaron de nuevo y se diferenciaron en el DMEM con bajo contenido en glucosa que contenía dexametasona  $10^{-7}$  M, ácido ascórbico 50  $\mu$ M, piruvato de sodio 1 nM, TGF- $\beta$  10 ng/ml y BMP-2 100 ng/ml durante 3 semanas, tal como se muestra en la figura 10. Se prepararon los condrocitos inducidos por diferenciación para obtener secciones en serie de 5  $\mu$ m a través de un procedimiento de incrustación en parafina, y se confirmó la capacidad de diferenciación en condrocitos a través de tinción con H/E, tinción con safranina O, tinción con azul

alción, tinción con rojo sirio, tinción con COMP, tinción de colágeno tipo II y I.

5 Tras subcultivarse mediante dos pases las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo y médula ósea cultivadas en ABM-M de la presente invención, se indujo la multidiferenciación de las mismas, y se realizó una comparación con un grupo de control sin multidiferenciación. Como resultado de realizar tinción con ALP y depósito de calcio tras la inducción en osteoblastos, se confirmaron la expresión de fosfatasa alcalina y el depósito de calcio a diferencia de en el grupo de control sin diferenciación inducida. Además, como resultado de realizar tinción con aceite rojo-O tras la inducción en adipocitos, se confirmó la diferenciación en adipocitos, a diferencia de en el grupo de control sin diferenciación inducida. A través de tinción con safranina O, tinción con azul alción, tinción con rojo sirio, tinción con COMP y tinción de colágeno tipo II y I, se confirmó la expresión de glucosaminoglucano (GAG) y proteoglucano, colágeno tipo I en los condrocitos diferenciados a partir de la masa de células madre mesenquimatosas, similar a cartílago normal.

#### 15 Ejemplo 4

##### Análisis del cariotipo de células madre mesenquimatosas cultivadas en ABM-M

20 Como 1-2 y 1-3 del ejemplo 1, se aíslan células madre mesenquimatosas de tejidos adultos, tales como médula ósea y tejido adiposo derivados de diferentes sujetos, y se subcultivaron diez pases en ABM-M que contenía suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM, y luego se analizó el cariotipo de las células madre mesenquimatosas cultivadas. Se sometieron a ensayo cinco de 20 células en metafase usando la técnica de bandeado GTG, y se escribieron los cariotipos de las mismas según el Sistema internacional de nomenclatura citogenética (2009). De las cinco células en metafase observadas, la figura 11 muestra cariotipo 46, XY normal, y la figura 12 muestra cariotipo 46, XX normal.

25 Tal como se describió anteriormente, las características celulares y la capacidad de diferenciación de células madre mesenquimatosas se mantienen en el medio de cultivo básico de células madre mesenquimatosas (ABM-M) de la presente invención en comparación con medios de cultivo de células madre mesenquimatosas convencionales, y el ABM-M de la presente invención se usa como medio para lograr una proliferación y crecimiento celulares excelentes en el cultivo en masa de células madre mesenquimatosas, obteniendo por ello células madre mesenquimatosas puras.

30

## REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo básico avanzado para células madre mesenquimatosas que comprende los componentes y sus respectivas cantidades en mg/l según se dan en la siguiente tabla:

5

Componente	Cantidad [mg/l]
Glicina	30
L-alanina	9
Monoclorhidrato de L-arginina	211
L-asparagina anhidra	50
Ácido L-aspártico	20
Diclorhidrato de L-cistina	62,6
Ácido L-glutámico	20
L-glutamina	584
Monoclorhidrato de L-histidina	42
L-Hidroxi-L-prolina	20
L-Isoleucina	105
L-Leucina	105
Monoclorhidrato de L-lisina	146
L-Metionina	30
L-Fenilalanina	66
L-Prolina	34,5
L-Serina	42
L-Treonina	95
L-Triptófano	16
Sal de disodio de L-tirosina dihidratada	103,79
L-valina	94
Cloruro de calcio dihidratado	265
Sulfato cúprico pentahidratado	0,0025
Sulfato ferroso heptahidratado	0,834
Sulfato de magnesio anhidro	97,67
Cloruro de potasio	400
Cloruro de sodio	6400
Fosfato de sodio dibásico anhidro	142,04
Sulfato de zinc heptahidratado	0,863
Fosfato de ácido ascórbico	50
Cloruro de colina	13,96
D-Biotina	0,2
D-Pantotenato de Ca	4
Ácido fólico	4
Mio-inositol	35
Nicotinamida (amida de ácido nicotínico)	4
Ácido p-aminobenzoico (PABA)	1

Clorhidrato de piridoxal	4
Riboflavina	0,4
Clorhidrato de tiamina	4
Vitamina B12	1,36
D-glucosa anhidra	4500
Hipoxantina	4,08
L-glutatión reducido	1
Ácido linoleico	0,084
Sal de sodio de rojo de fenol	15,9
Putrescina+2HCl	0,161
Piruvato de sodio	110
Ácido tióctico	0,21
Timidina	0,73

- 5 2. Medio de cultivo básico avanzado para células madre mesenquimatosas según la reivindicación 1, en el que las células madre mesenquimatosas presentan características inmunológicas celulares de manera que los marcadores de superficie positivos CD166, CD105, CD90, CD44, CD29, CD73 y HLA-ABC se expresan al 80% o más, especialmente los marcadores de superficie positivos CD44, CD105, CD90, CD73 y CD166 se expresan al 95% o más, y los marcadores de superficie negativos CD31, CD34, CD45, CD80 y HLA-DR se expresan al 5% o menos.

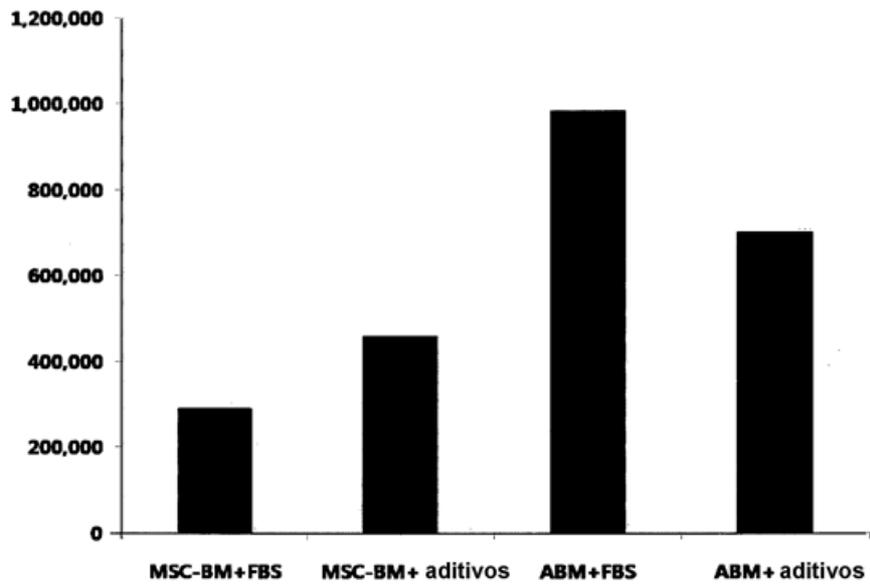


Fig.1

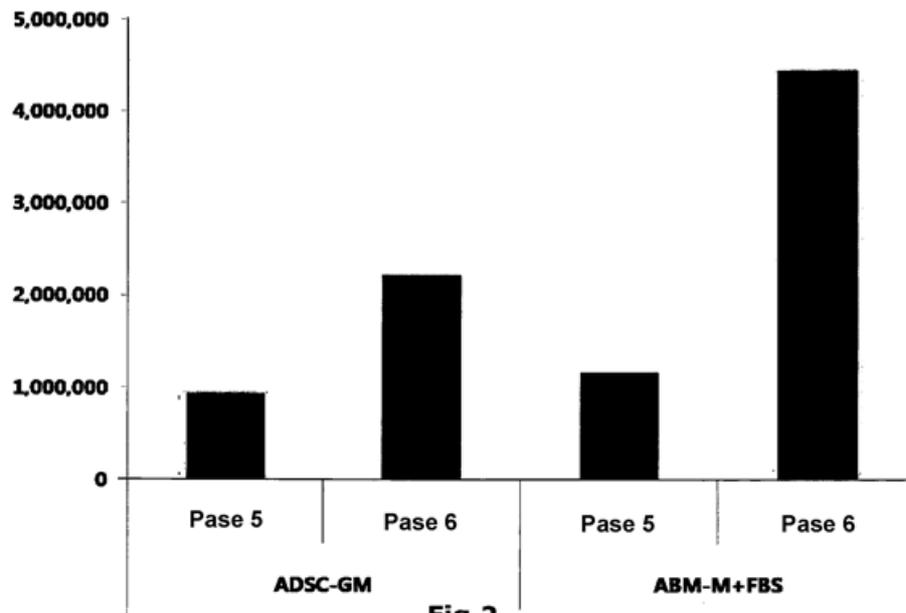


Fig.2

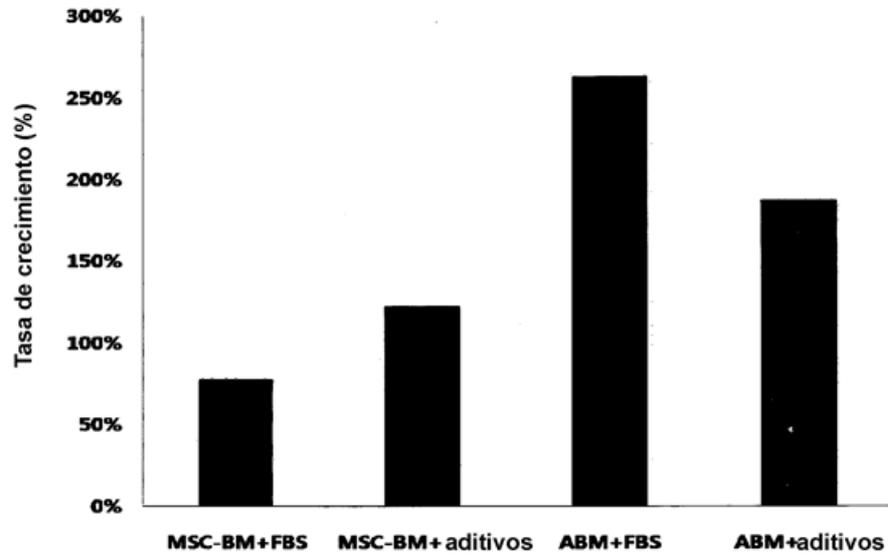


Fig.3

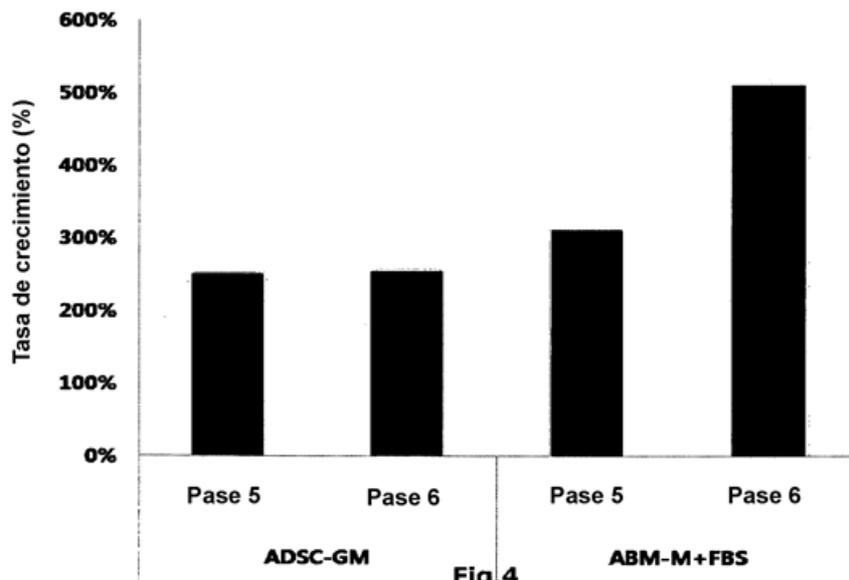
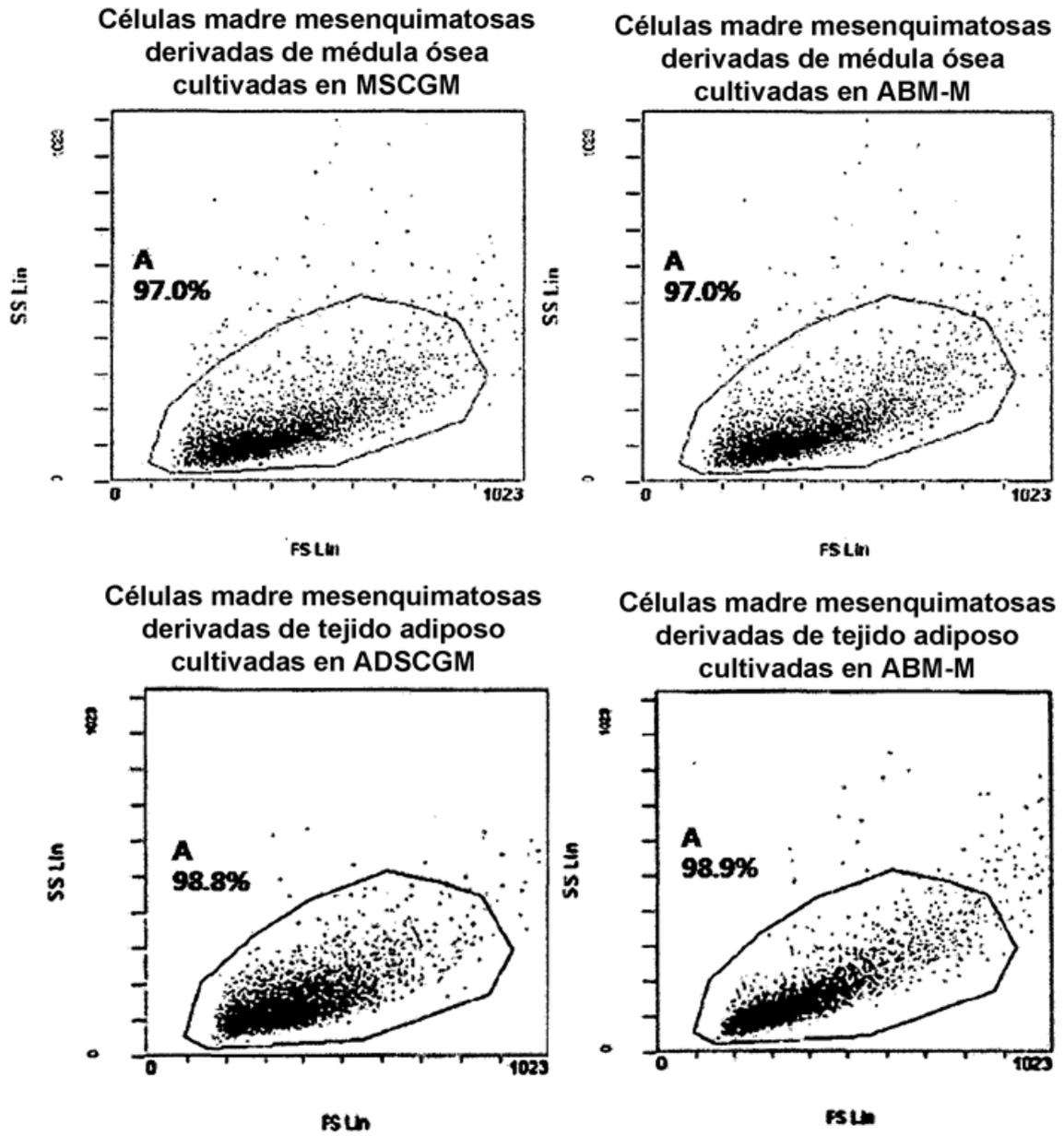


Fig.4

[fig. 5]



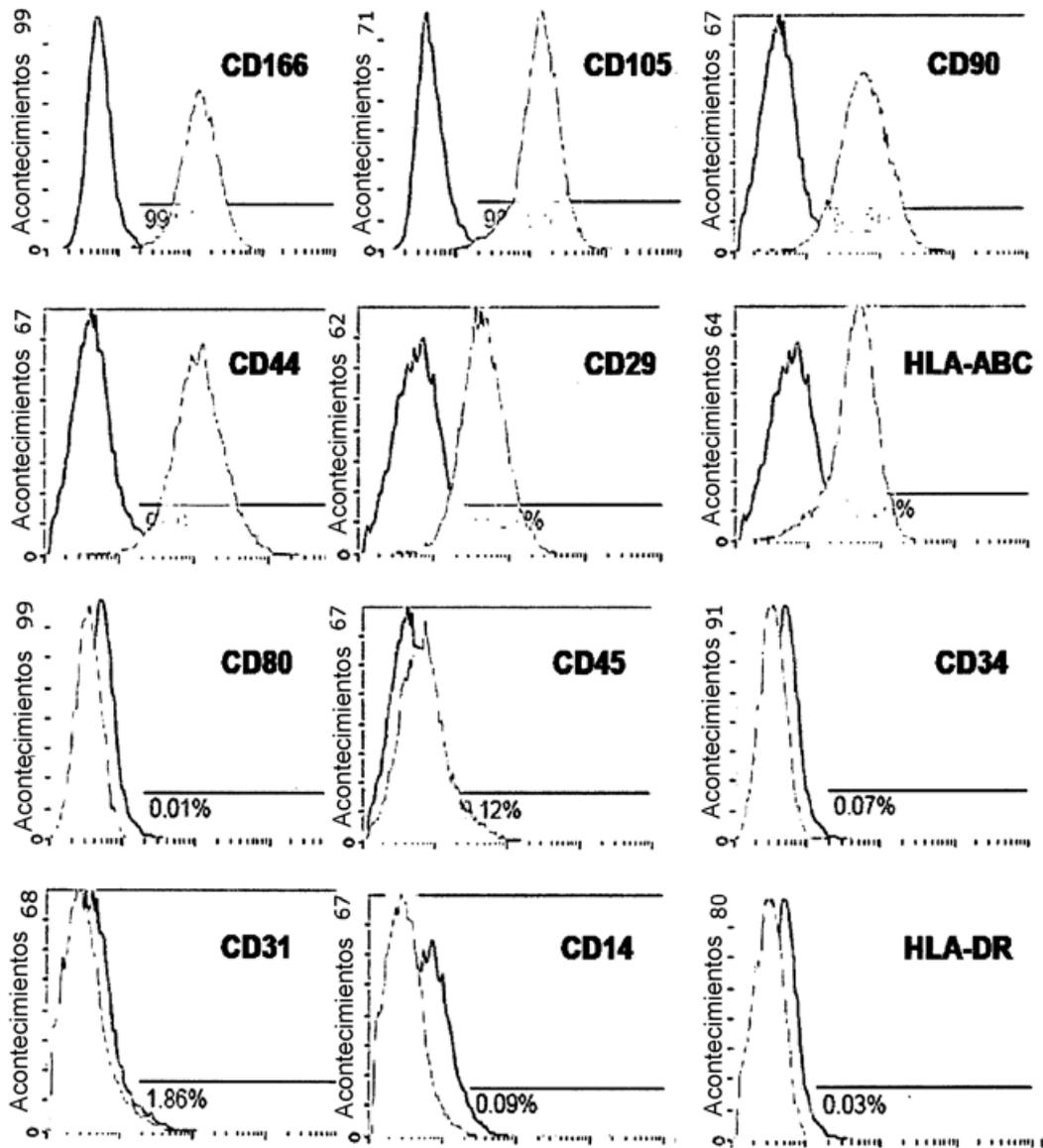


Fig.6

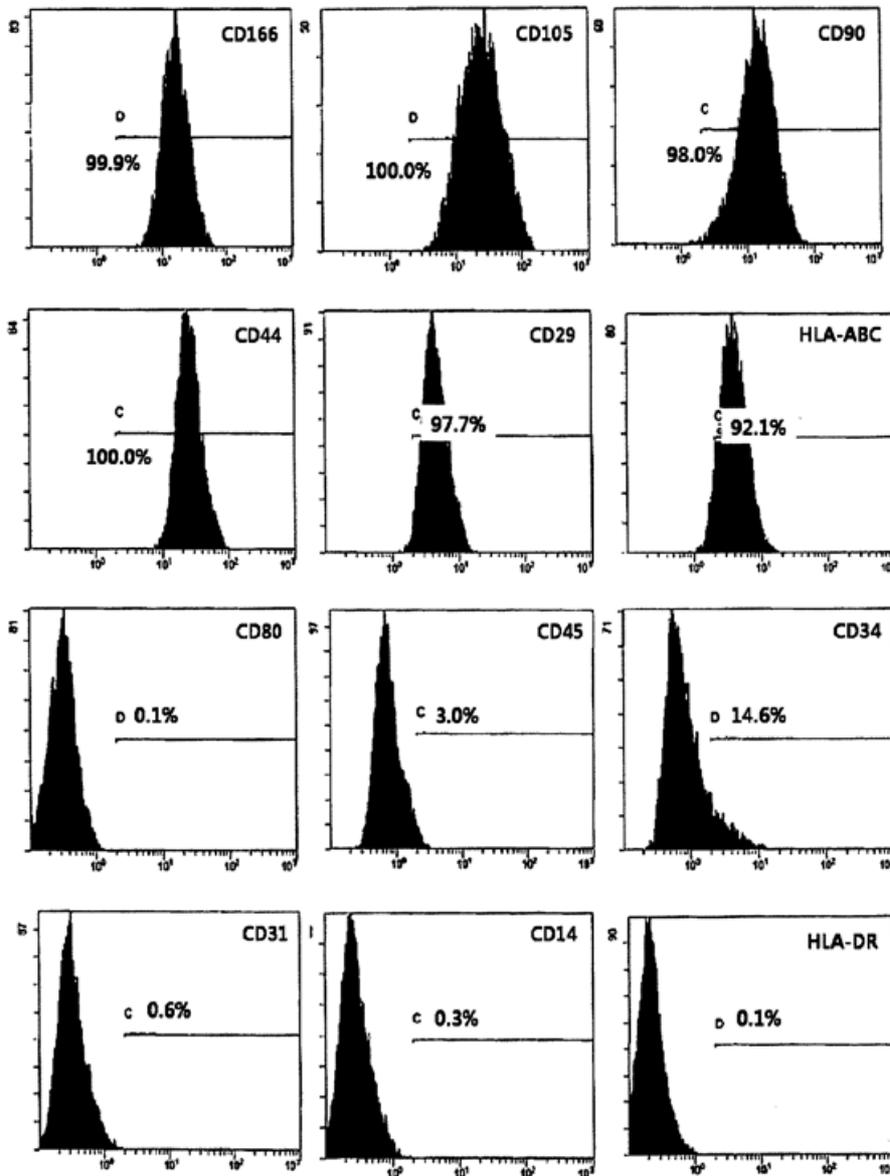
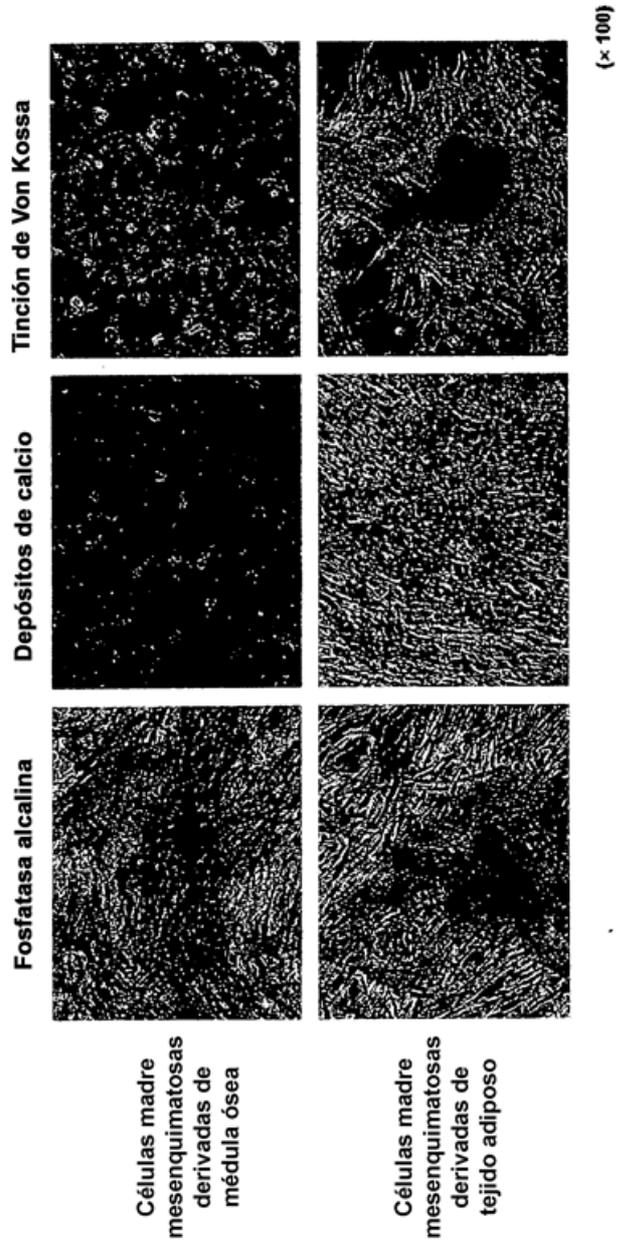


Fig.7

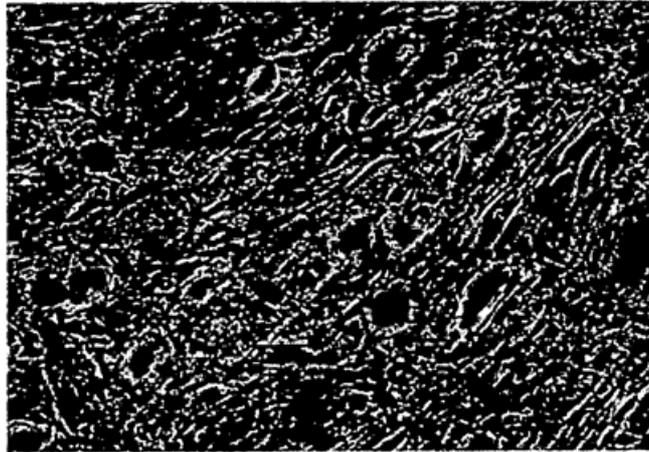
[fig. 8]



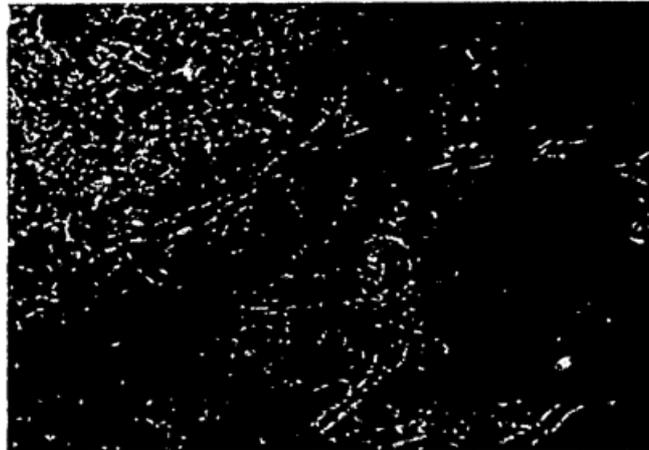
[fig. 9]

**Aceite rojo-O**

**Células madre  
mesenquimatosas  
derivadas de  
médula ósea**



**Células madre  
mesenquimatosas  
derivadas de  
tejido adiposo**



**(× 100)**

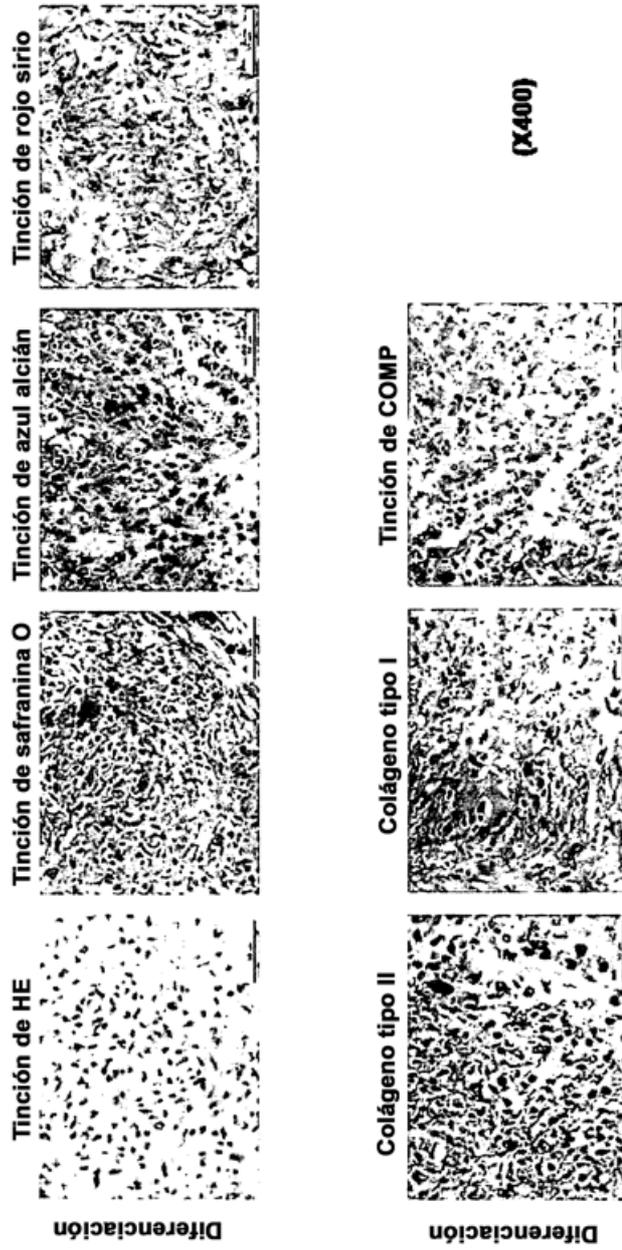


Fig.10



Fig.11

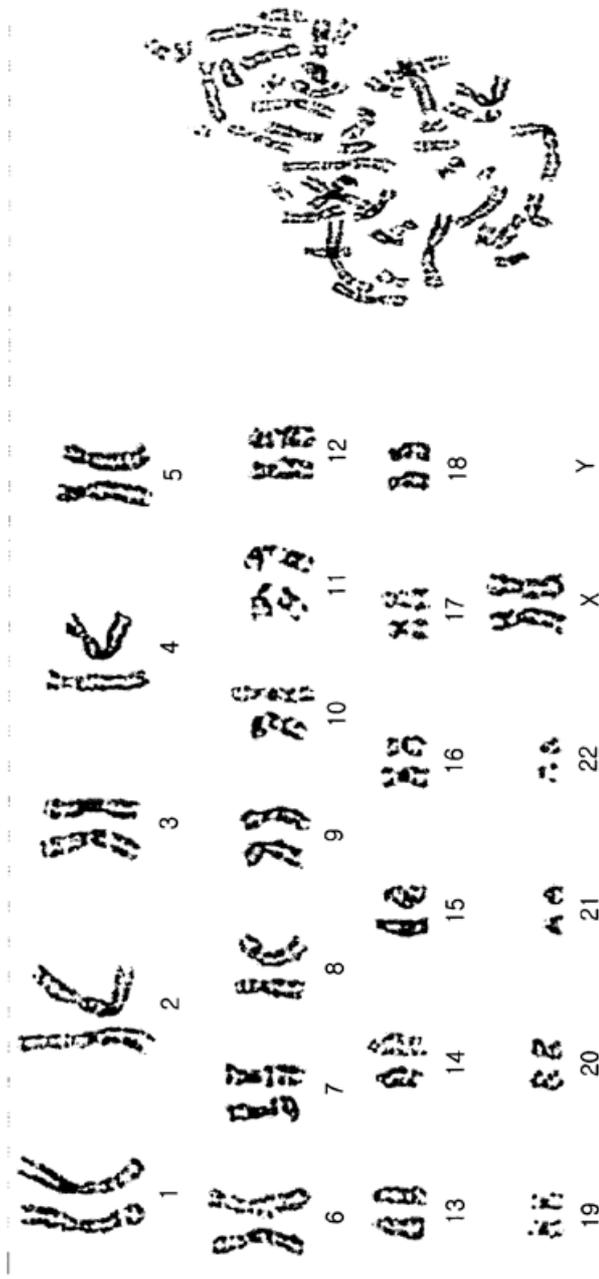
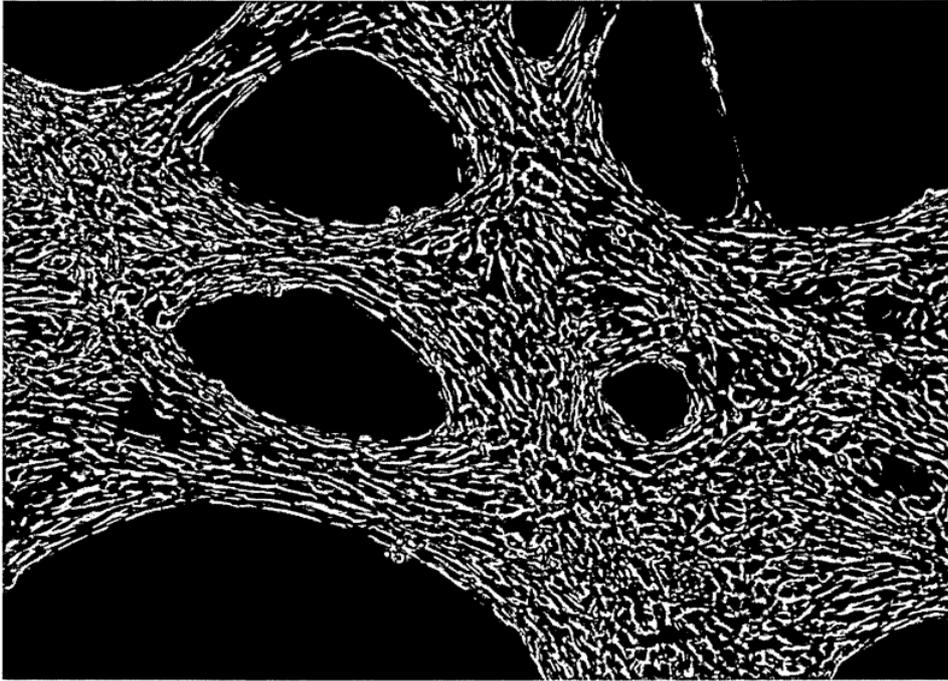


Fig.12



**Fig.13**