

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 071**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2014 PCT/KR2014/008079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15034212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2014 E 14842224 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 3041930**

54 Título: **Método para cultivar células madre mesenquimales de acuerdo con el tamaño de las células**

30 Prioridad:

05.09.2013 KR 20130106673

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

19.11.2018

73 Titular/es:

**MEDIPOST CO., LTD. (100.0%)
21 Daewangpangyo-ro 644beon-gil, Bundang-gu,
Seongnam-si
Gyeonggi-do 13494, KR**

72 Inventor/es:

**YANG, YOON-SUN;
OH, WON IL;
JIN, HYE JIN;
KWON, SOON-JAE y
KIM, MIYEON**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 690 071 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 cultivar células madre mesenquimales de acuerdo con el tamaño de las células

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para cultivar células madre mesenquimales de acuerdo con el tamaño celular. Más particularmente, se refiere a un método para aislar células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior, y para cultivarlas en condiciones particulares, en el que el aislamiento no comprende métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y no comprende métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal.

Antecedentes de la invención

15 Una "célula madre" es un nombre genérico para un tipo indiferenciado de célula corporal encontrada en tejidos de embriones, fetos y adultos, que tiene el potencial de diferenciación en una diversa gama de tipos de células especializadas.

20 Las células madre se pueden clasificar, dependiendo de su potencia, en: células madre pluripotentes, células madre multipotentes y células madre unipotentes. Las células madre pluripotentes tienen pluripotencia para diferenciarse en cualquier tipo de células. Las células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas (iPS) son representativas de células madre pluripotentes. Las células madre adultas muestran multipotencia y/o unipotencia. Entre ellas se encuentran las células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales y células madre neuronales.

25 A pesar de diversos intentos para usar las células madre embrionarias humanas pluripotentes en terapias celulares, la alta probabilidad de oncogénesis y respuesta de rechazo inmunológico todavía permanecen y son obstáculos difíciles de superar.

30 En el caso de las células iPS, que son un tipo de células madre revertidas de forma intencionada a partir de células adultas completamente diferenciadas a su etapa inicial de estadio de células madre embrionarias mediante reprogramación, el riesgo de respuesta de rechazo inmunológico se podría descartar debido a que son células autólogas, pero el riesgo de oncogénesis sigue siendo un problema por resolver.

35 Como una alternativa para resolver estos problemas, se han sugerido células madre mesenquimales porque presentan efectos inmunomoduladores y no presentan riesgo de oncogénesis. Las células madre mesenquimales son células madre multipotentes que se pueden diferenciar en una diversidad de tipos de células, incluyendo adipocitos, osteoblastos, condrocitos, mioblastos, neuroblastos, miocardioblastos, hepatocitos, células beta de los islotes y células vasculares, y se sabe que tienen la función de modular las respuestas inmunológicas.

40 Las células madre mesenquimales se pueden aislar a partir de diversos tejidos, tales como médula ósea, sangre del cordón umbilical y tejido adiposo, pero pueden no estar suficientemente definidas porque los marcadores de superficie celular son algo diferentes entre sí de acuerdo con el origen a partir del que se obtienen las células madre mesenquimales. Generalmente, si se pueden diferenciar en osteoblastos, condrocitos y mioblastos, tienen una morfología en forma de huso y expresan los marcadores de superficie CD73(+), CD105(+), CD34(-) y CD45(-), tales células madre se definen como células madre mesenquimales. En este contexto, las células madre mesenquimales de diferentes orígenes y/o antecedentes genéticos no se diferencian entre sí de forma significativa bajo la definición convencional, pero son significativamente diferentes entre sí en términos de actividad *in vivo*. Además, cuando las células madre mesenquimales se usan como un agente terapéutico de células exógenas, un grupo limitado de células madre mesenquimales no permite otras opciones disponibles, incluso a pesar de su baja actividad *in vivo*.

Además, para aplicar las células madre mesenquimales a la práctica clínica, es esencial obtener una gran cantidad de células en estadios iniciales y cultivarlas con pases, teniendo en cuenta la cantidad limitada de las células madre mesenquimales que se pueden obtener a partir de tejidos. Sin embargo, las células madre mesenquimales forman un grupo muy heterogéneo durante los pases, lo que influye en la proliferación, diferenciación, y envejecimiento de las células, haciendo que las células madre mesenquimales sea difícil de desarrollar como agentes terapéuticos.

En un esfuerzo para superar estos problemas, Li J *et al.*, Cell Research, 2008; Majore I *et al.*, Cell Communication and Signaling, 2009 y Rataiczak MZ *et al.*, Aging, 2012 desvelan una diversidad de métodos para cultivar células madre mesenquimales. Sin embargo, estos métodos tienen varias desventajas: con los métodos se obtienen células heterogéneas, haciendo difícil obtener el número necesario de células para producción en masa, y la capacidad proliferativa de las células disminuye después de cada pase y el envejecimiento de las células evolucionan rápida. Además, el equipo usado en los artículos mencionados anteriormente no era adecuado para un buen proceso de fabricación (GMP), haciendo que su aplicación a procesos de fabricación reales sea difícil. Como tal, de una necesidad de un método para extraer grupos homogéneos de células y hacerlas proliferar de forma eficaz y con bajo coste.

El documento WO 2013/121426 se refiere al cultivo de células madre mesenquimales obtenidas a partir de, por ejemplo, sangre del cordón umbilical en un medio que comprende nicotinamida, FGF4, y preferentemente más de 2 mM de calcio en condiciones de hipoxia. El cultivo en estas condiciones se describe para dar como resultado el aumento de la prevalencia de células con tamaños más pequeños de aproximadamente 18-19 μm .

5

Sumario de la invención

Por lo tanto un objeto de la presente invención es proporcionar un método para cultivar células madre mesenquimales de forma eficaz.

10

Además en el presente documento se desvelan células madre mesenquimales preparadas usando el método que se ha mencionado anteriormente, que puede tener una mejora de la capacidad proliferativa y potencial de diferenciación.

15

Además en el presente documento se desvela un agente terapéutico celular que comprende las células madre mesenquimales.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para cultivar células madre mesenquimales, que comprende las etapas de: (1) aislar células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior; y (2) cultivar las células madre mesenquimales en un medio que contiene de 2,1 a 3,8 mM de calcio y de 1,0 a 3,0 mM de magnesio en una condición de un 2 a un 5 % de oxígeno, en el que el aislamiento no comprende métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y no comprende métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal.

20

25

Las células madre mesenquimales preparadas con el método que se ha mencionado anteriormente pueden presentar una mejora de la capacidad proliferativa y el potencial de diferenciación.

Además en el presente documento se desvela un agente terapéutico celular que comprende las células madre mesenquimales.

30

Además, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para mejorar la capacidad proliferativa y el potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales, que comprende las etapas de: (1) aislar células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior; y (2) cultivar las células madre mesenquimales aisladas en un medio que contiene de 2,1 a 3,8 mM de calcio y de 1,0 a 3,0 mM de magnesio en una condición de un 2 a un 5 % de oxígeno, en el que el aislamiento no comprende métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y no comprende métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal.

35

40

Las células madre mesenquimales obtenidas con los métodos de la presente invención se pueden usar como un agente terapéutico celular.

Breve descripción de las figuras

45

La FIG. 1 muestra fotografías de células madre mesenquimales, de forma que se unan antes del tratamiento con tripsina (FIG. 1a) y en forma de células individuales después de tratamiento con tripsina. También se muestra un gráfico que ilustra una distribución del tamaño de las células medido con Cellometer (FIG. 1c).

50

Las FIGs. 2A y 2B son gráficos que muestran distribuciones de tamaño de células medidos con Cellometer, después de cultivo de células madre mesenquimales (las MSC N.º 1 a N.º 4).

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la duplicación de población acumulativa (CPD) de un grupo celular I que tienen un tamaño pequeño (las MSC N.º 1 y N.º 2), y un grupo celular II que tienen un tamaño celular grande (las MSC N.º 3 y N.º 4), después de cultivo de las células con pases.

55

La FIG. 4 es una fotografía microscópica de células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior (pequeñas) obtenidas de acuerdo con un método de la presente invención.

60

La FIG. 5a proporciona fotografías microscópicas de un grupo de células no aisladas (original, parte izquierda), un grupo de células con un tamaño celular que supera 8 μm (grandes, parte media), y un grupo celular con un tamaño de células de 8 μm o inferior (pequeños, parte derecha). Las FIGs. 5b y 5c son gráficos que muestran capacidad de proliferación y duplicación de población acumulativa (CPD) de los tres grupos, respectivamente.

65

La FIG. 6 son gráficos que muestran capacidad proliferativa de acuerdo con la proporción de células mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior. Los grupos 1 a 5 en los gráficos se refieren a células madre mesenquimales (MSC) formadas por: las MSC que superan 8 μm (100 %); las MSC que superan 8 μm (75 %) + las MSC de 8 μm o menos (25 %); las MSC que superan 8 μm (50 %) + las MSC de 8 μm o menos (50 %); las MSC que

superan 8 μm (25 %) + las MSC de 8 μm o menos (75 %); y las MSC de 8 μm o menos (100 %), respectivamente. La capacidad proliferativa de cada grupo se presenta como un porcentaje de aumento en comparación con el Grupo 1.

La FIG. 7 muestra resultados de examen de una forma celular (a, b) y capacidad de proliferación de las células (c), después de cultivo de un grupo celular con un tamaño de 8 μm o menos (pequeñas) y grupo de células no aisladas (original), en una condición de cultivo convencional (control), condición de calcio adicional (incluyendo magnesio) (Ca^{2+} (Mg^{2+})), condición de hipoxia (hipoxia), y condición de calcio (incluyendo magnesio) adicional/condición de hipoxia (CMH).

La FIG. 8 proporciona gráficos que muestran resultados de medición de la capacidad de proliferación (8A) y duplicación de población acumulativa (8B), después de cultivo de grupo de células aisladas (original) y grupos de células pequeñas de 4 tipos de células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical (las MSC N.º 1 a N.º 4) con pases en una condición de cultivo convencional y una condición de CMH.

La FIG. 9 es el resultado de recuentos celulares después de cultivo de un tipo de células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical (MSC N.º 1) en los medios que contienen calcio a la concentración de 1,8 a 4,4 mM durante 6 días.

La FIG. 10 es el resultado de recuentos celulares después de cultivo de un tipo de células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical (MSC N.º 1) en las condiciones de oxígeno normal (normoxia), y un 3 % y un 5 % de oxígeno.

La FIG. 11 proporciona resultados de transferencia de Western y un gráfico de cuantificación que muestra los niveles de expresión de p53 y p21 (marcadores inhibidores de la proliferación) después de cultivo del grupo de células originales y grupo de células pequeñas en una condición de cultivo convencional y una condición de CMH.

Las FIGs. 12A y 12B proporcionan fotografías de células envejecidas que se tiñeron, y gráficos que muestran la proporción de recuentos de células teñidas con respecto al de los recuentos de células totales, después de cultivo del grupo de células originales y el grupo de células pequeñas con varios pases en una condición de cultivo convencional y una condición de cultivo con CMH, e inducción de senescencia de las células.

La FIG. 13 proporciona fotografías que muestran inducción osteogénica (a) e inducción adipogénica (b) después de cultivo del grupo de células originales y el grupo de células pequeñas en una condición de cultivo convencional y una condición de cultivo con CMH.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para cultivar células madre mesenquimales, que comprende las etapas de (1) aislar células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior; y (2) cultivar las células madre mesenquimales aisladas en un medio que contiene de 2,1 a 3,8 mM de calcio y de 1,0 a 3,0 mM de magnesio en una condición de un 2 a un 5 % de oxígeno, en el que el aislamiento no comprende métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y no comprende métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que las células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior tienen una capacidad proliferativa más elevada que las de otro tamaño, y la capacidad proliferativa y potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales se puede mejorar adicionalmente cultivándolas en un medio que contiene concentraciones específicas de calcio y magnesio en una condición de hipoxia.

En el método para cultivar células madre mesenquimales de la presente invención, la etapa (1) es una etapa de aislamiento de las células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior.

El método de cultivo de la presente invención se puede aplicar a células madre mesenquimales de diversos orígenes. Los ejemplos de las células madre mesenquimales útiles en la presente invención incluyen las obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical, médula ósea, lípido, músculo, piel, líquido amniótico, cordón umbilical, o dientes. En una realización preferente de la presente invención, el método de cultivo de la presente invención se aplica a células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical.

Además, las células madre mesenquimales a las que se puede aplicar el método de cultivo de la presente invención se pueden obtener a partir de diversos objetos. Por ejemplo, las células madre mesenquimales útiles en la presente invención se pueden obtener a partir de mamíferos incluyendo seres humanos. En una realización preferente de la presente invención, se usan células madre mesenquimales de origen humano.

Aunque las células madre mesenquimales convencionales tienen un intervalo de tamaños de 3,5 a 24 μm , las células madre mesenquimales usadas en la presente invención se caracterizan por que tienen un tamaño de 8 μm o

inferior (pequeñas). Las células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior tienen una capacidad proliferativa superior a la de las células madre mesenquimales no aisladas (en lo sucesivo en el presente documento denominadas "células originales") o células madre mesenquimales con un tamaño que supera 8 μm .

5 En el método de la presente invención, el aislamiento de las células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior se puede realizar preferentemente usando un filtro, aunque no hay ninguna limitación en particular. El filtro se puede seleccionar teniendo en cuenta el riesgo de daño a las células madre mesenquimales y la seguridad en su uso tal como, por ejemplo, tuvo de membrana de filtración de Xiaogan yaguang. El método para aislamiento usando el filtro se puede realizar en la condición óptima para obtener células pequeñas. Por ejemplo, las células madre mesenquimales a la población de 2×10^5 células se pueden cargar en un tubo de membrana de filtración que tiene un tamaño de poro de 8 μm , y se pueden centrifugar una vez a 1.200 rpm durante 5 min, para obtener células madre mesenquimales homogéneas que tienen un tamaño de 8 μm o inferior.

15 En lo sucesivo en el presente documento las células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior se denominan "células pequeñas".

La etapa (2) de un método para cultivar células madre mesenquimales de la presente invención es una etapa de cultivo de las células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior en un medio que contiene de 2,1 a 3,8 mM de calcio y de 1,0 a 3,0 mM de magnesio en una condición de hipoxia de un 2 a un 5 % de oxígeno.

20 El método de cultivo se caracteriza principalmente por el cultivo de las células madre mesenquimales en un medio que contiene calcio y magnesio.

25 El medio de cultivo se puede preparar a partir un medio de cultivo convencional para células madre ajustando las concentraciones de calcio y magnesio. Los ejemplos de los medios de cultivo convencionales incluyen medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM), medio mínimo esencial (MEM), α -MEM, medio 5A de McCoys, medio basal de Eagle, medio del Connaught Medical Research Laboratory (CMRL), medio mínimo esencial de Glasgow, medio F-12 de Ham, medio de Dulbecco modificado con Iscove (IMDM), medio L-15 de Leibovitz, medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), medio 199, y medio de 199 de Hank.

30 Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener o no un suero. Además, se puede usar una sustitución de suero, en lugar de un suero, en el medio de cultivo.

35 En una realización de la presente invención, el medio de cultivo contiene de un 5 a un 30 % de suero bovino afectada (FBS). En otra realización, el medio de cultivo contiene una sustitución de suero. Además de un producto disponible en el mercado, como sustitución de suero se pueden usar diversos factores de crecimiento en un suero humano o un suero de plaquetas humano, incluyendo PDGF, TGF, IGF, y citoquinas similares a esto.

40 En el método de cultivo de la presente invención, el calcio funciona para estimular la proliferación de células madre mesenquimales, con la supresión de inmunogenicidad y la estimulación de secreción de citoquinas. En este sentido, el calcio se puede usar a la concentración de 2,1 a 38 mM en el medio, preferentemente a la concentración de 3,3 a 3,8 mM, y más preferentemente a la concentración de aproximadamente 3,6 mM. Por ejemplo, cuando se adopta α -MEM como medio de cultivo, se puede añadir calcio a la concentración de 0,3 a 2,0 mM, preferentemente a la concentración de 1,5 a 2,0 mM, y más preferentemente a la concentración de aproximadamente 1,8 mM por qué el medio ya contiene 1,8 mM de calcio. De forma análoga, cuando se adopta otro medio, la concentración de calcio a añadir para conseguir la concentración necesaria deseada para el método de cultivo de la presente invención se puede calcular fácilmente teniendo en cuenta la concentración de calcio del propio medio.

50 En un medio de cultivo de la presente invención, se usa magnesio para evitar la precipitación de calcio. El magnesio se puede usar a la concentración de 1,0 a 3,0 mM en el medio, y preferentemente a la concentración de aproximadamente 1,8 mM. Cuando el magnesio está presente a una concentración inferior a 1,0 mM en el medio de cultivo, es difícil prevenir la precipitación de calcio. Por otro lado, es probable que una concentración de magnesio superior a 3,0 mM en el medio de cultivo bloquee la formación de la matriz extracelular (ECM), interfiera con la adherencia de las células en la parte inferior de la placa de cultivo, haciendo de este modo que sean susceptibles a la tensión por cizalladura, y aumento de la mineralización intracelular. Por ejemplo, cuando se adopta α -MEM como un medio de cultivo, se puede añadir magnesio a la concentración de 0,2 a 2,2 mM, y preferentemente a la concentración de 1,0 mM porque el medio ya contiene 0,8 mM de magnesio. De forma análoga, cuando se adopta otro medio, la concentración de magnesio para añadir para conseguir la concentración deseada necesaria para que el método de cultivo de la presente invención se pueda calcular fácilmente teniendo en cuenta la concentración de magnesio del propio medio.

65 Por lo tanto, un medio de cultivo de acuerdo con una realización preferente de la presente invención se puede basar en α -MEM suplementado con un 5 a un 30 % de suero bovino fetal (FBS), de 0,3 a 2,0 mM de calcio, y de 0,2 a 2,2 mM de magnesio, preparando de ese modo finales de calcio y magnesio de 2,1 a 3,8 mM y de 1,0 a 3,0 mM, respectivamente.

Además, otra característica del método de cultivo de la presente invención es una condición de cultivo hipóxica para células madre mesenquimales. En comparación con una condición de oxígeno normal (normoxia), la condición de hipóxia estimula la proliferación de las células madre mesenquimales, con la supresión de la inmunogenicidad y la estimulación de secreción de citoquinas. En este sentido, la condición de hipóxia indica un contenido de oxígeno de un 2 a un 5 %. Un problema asociado con una concentración de oxígeno inferior a un 2 % o por encima de un 5 % es una disminución significativa de la proliferación de células madre mesenquimales. Es preferente que las células madre mesenquimales se cultiven en un nivel de oxígeno de aproximadamente un 3 %. Una condición de hipóxia se puede conseguir ajustando la concentración de oxígeno en una incubadora celular. Por ejemplo, una incubadora se puede suministrar con gas nitrógeno (100 %) o mezcla de gas nitrógeno/dióxido de carbono (95 %/5 %) para cambiar de una atmósfera normóxica a una atmósfera hipóxica. La concentración de oxígeno en una incubadora se puede monitorizar en una incubadora equipada con un sensor de oxígeno.

Excepto para las condiciones de la presente invención que se han mencionado anteriormente, las células madre mesenquimales se pueden cultivar de manera convencional. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden cultivar en un biorreactor tridimensional o centrifugadora o un recipiente de cultivo adherente convencional.

Cuando una primera característica de la concentración de control de calcio y magnesio se combina con una segunda característica para una condición de hipóxia, se puede obtener un efecto sinérgico. Es decir, una combinación de la concentración particular de calcio y magnesio y una condición de hipóxia permite que las células madre mesenquimales proliferen de forma más eficaz, con una mejora más elevada de la supresión de la inmunogenicidad y la estimulación de secreción de citoquinas, en comparación con las condiciones individuales. La condición combinada para un método de cultivo de la presente invención se denomina "condición de CMH" (condición de calcio + magnesio + hipóxica).

Un método de cultivo de la presente invención se puede aplicar a pases de células madre mesenquimales. En otras palabras, las células madre mesenquimales cultivadas usando un método de cultivo de la presente invención se pueden sub-cultivar de la misma forma. Permitiendo que las células madre mesenquimales proliferen de forma más eficaz, un método de cultivo de la presente invención tiene la ventaja de producir un número mayor de células madre mesenquimales incluso cuando se realizan pocos pases. Por ejemplo, después de 5 pases en los que se inóculo el mismo número de células y se cultivaron durante un periodo de tiempo uniforme en cada pase, se encuentra que un método de cultivo de la presente invención produce células madre mesenquimales de 100 a 1.000 veces mayor en número que el de los métodos convencionales.

Por consiguiente, la capacidad proliferativa y el potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales preparadas con el método que se ha mencionado anteriormente se puede mejorar.

Además, en el presente documento se desvela un agente terapéutico celular que incluye las células madre mesenquimales obtenidas con el método de cultivo y se ha mencionado anteriormente. Un agente terapéutico celular de ese tipo se puede aplicar en la regeneración o protección de adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos, neurocitos, cardiomiocitos, hepatocitos, células beta de los islotes, células vasculares, o neumocitos. Además, un agente terapéutico celular de ese tipo es útil para uno seleccionado entre el grupo que consiste en el tratamiento de enfermedades pulmonares; la supresión o tratamiento de inflamación inducida por enfermedad pulmonar; la regeneración de tejidos pulmonares; y la supresión de fibrosis pulmonar. En particular, se puede usar para suprimir o mejorar la inflamación inducida por enfermedad pulmonar y fibrosis. Además, un agente terapéutico celular de ese tipo se puede aplicar a la terapia de enfermedades cardiovasculares o la regeneración de cartílago. Además, un agente terapéutico celular de ese tipo puede mejorar las funciones inmunomoduladoras; reducir una de respuestas inmunológicas, penetración de células inmunológicas, o inmunogenicidad; y suprimir reacciones inflamatorias.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle con ejemplos. Los ejemplos no cubiertos con el alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

Ejemplo 1: Análisis de Tamaño Celular de Células Madre Mesenquimales Obtenidas a partir de Sangre del Cordón Umbilical

El tamaño celular de las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical no aisladas se midió como sigue a continuación.

De forma específica, las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical se obtuvieron a partir de 4 donantes y se mantuvieron congeladas. Cada colección de las células madre mesenquimales se descongeló y se cultivó en una incubadora con medio α -MEM suplementado con un 10 % de FBS, en la condición de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 5 días.

La morfología de las células se observó con un microscopio, y las células individuales se obtuvieron por tratamiento con tripsina. Las células individuales se trataron con azul de tripano para examinar la tasa de supervivencia. Las células se observaron con el microscopio inverso ECLIPSE TE2000-U (Nikon) con un aumento de 100X, y se fotografiaron múltiples regiones de la población celular. En las regiones fotografiadas, el tamaño de las células vivas

se analizó usando Cellometer vision 5X (nexcelom biosceince).

La FIG. 1 muestran las fotografías tomadas con el microscopio. La FIG. 1a es una fotografía que muestra células madre mesenquimales cultivadas aisladas a partir de sangre del cordón umbilical, y la FIG. 1b es una fotografía que muestra células madre mesenquimales en forma de células individuales después de tripsinización. La FIG. 1c es un gráfico que muestra resultados de medición del tamaño celular.

Como se puede observar a partir de la FIG. 1, no se pudo obtener información sobre el tamaño celular cuando las células eran adherentes entre sí (FIG. 1a), pero tamaño celular se pudo examinar cuando las células estaban en forma de células individuales (FIG. 1b). Después de análisis con Cellometer, se confirmó que las células madre mesenquimales constituyen una población de células heterogénea con diversos tamaños que varían de 4,84 a 18,52 μm (FIG. 1c).

Ejemplo 2: Análisis sobre la Capacidad Proliferativa de Células Madre Mesenquimales Obtenidas a partir de Sangre del Cordón Umbilical De Acuerdo con Su Tamaño

Con el fin de analizar la correlación entre el tamaño celular y la capacidad proliferativa de células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical, las células madre mesenquimales obtenidas a partir de cuatro donantes (las MSC N.º 1 a N.º 4) se cultivaron con el método que se ha descrito en el Ejemplo 1, y a continuación con el tamaño celular se analizó usando Cellometer. Los resultados del análisis se muestran en las FIGs. 2A y 2B. Se confirmó que el tamaño celular de las MSC N.º 1 y N.º 2 era relativamente pequeño tal como se puede observar a partir de la FIG. 2A, mientras que el tamaño celular de las MSC N.º 3 y N.º 4 era relativamente grande tal como se puede observar a partir de la FIG. 2B.

El Grupo I (las MSC N.º 1 y N.º 2) que tiene un tamaño celular pequeño y el Grupo II (las MSC N.º 3 y N.º 4) que tiene un tamaño celular grande se cultivaron con pases, y se prepararon curvas de crecimiento acumulativo. La curva de crecimiento acumulativo se expresa como la duplicación de población acumulativa (CPD) que es un valor acumulativo de la duplicación de la población (PD).

La PD se calcula basándose en el número total de células de cada pase, que es $\log$ (tasa de proliferación de un pase específico) / $\log 2$. Cuando las células de un pase específico alcanzan de un 50 a un 60 % de confluencia, se tratan con tripsina y se separan, para cosechar las células individuales. La tasa de proliferación de un pase específico se calculó dividiendo el número de las células individuales cosechadas entre el número de células que se habían proporcionado inicialmente al recipiente de cultivo. Estos procedimientos se repitieron hasta un pase en el que se detiene la proliferación de las células. Se permitió que las células proliferaran partiendo del primer y segundo paso es hasta que el último pase en el que se detiene la proliferación de las células. El periodo de cultivo por pase fue de 7 días. En el gráfico, P1 a P10 se refiere al número de pases. Los resultados experimentales se muestran en la FIG. 3.

Como se puede observar a partir de la FIG. 3, se confirmó que la capacidad proliferativa en el Grupo I que tenía un tamaño celular pequeño era mayor que la del Grupo II que tenía un tamaño celular grande, y que la proliferación de células en el Grupo I duró un periodo de tiempo superior al del Grupo II.

Ejemplo 3: Determinación de Tamaño Celular Y Aislamiento de Células Pequeñas

<3-1> Determinación del tamaño celular adecuado para aislamiento

Como filtro para el análisis de células de acuerdo con su tamaño, se seleccionó el tubo de membrana de filtración de Xiaogan yaguang. El filtro se puede proteger de la contaminación del exterior durante la centrifugación, debido a su instalación dentro de un tubo de 50 ml. Al mismo tiempo, se conocen equipos para aislar células, tales como equipo de clasificación, centrifugadora de alta velocidad de Beckman o Transwell® de BD. Pero, el equipo de clasificación no es adecuado para un procedimiento de preparación de agentes terapéuticos debido a la posibilidad de dañar las células durante un proceso de separación de las células. El equipo de centrifugadora de alta velocidad de Beckman no es adecuado para uso o en un proceso de preparación de GMP por qué no usar productos desechables para partes consumibles. Al igual que para Transwell®, que no es un sistema sellado herméticamente, no se garantiza la condición aséptica de las células durante la centrifugación. Teniendo en cuenta que las células madre mesenquimales obtenidas con los métodos de la presente invención se deberían usar como un agente terapéutico, se determinó que el tubo de membrana de filtración de Xiaogan yaguang adecuado para la instalación real de preparación de GMP era el más adecuado.

Usando el tubo de membrana de filtración, se aislaron las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical con un tamaño de 3 μm o inferior ($\leq 3 \mu\text{m}$), 5 μm o inferior ($\leq 5 \mu\text{m}$), y 8 μm o inferior ($\leq 8 \mu\text{m}$). La cantidad de cada una de las células aisladas se midió. Como resultado, la cantidad de las células con un tamaño $\leq 3 \mu\text{m}$ o $\leq 5 \mu\text{m}$ aislada por el filtro, así como el porcentaje de dichas células entre la población de células madre mesenquimales, era demasiado baja. Por el contrario, las células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior se obtuvieron en una cantidad suficiente. Como tal, se determinó que un tamaño

celular adecuado era de 8 μm o inferior, y las células de este intervalo de tamaños se denominan "células pequeñas" o "células madre mesenquimales pequeñas".

<3-2> Establecimiento de las condiciones óptimas para la adquisición de células pequeñas

- 5 Para establecer las condiciones óptimas para la adquisición de células que tienen un tamaño de 8 μm o inferior, se investigaron las condiciones de centrifugación (velocidad y tiempo de duración de la centrifugación), el número de células cargadas y la tasa de adquisición de células de acuerdo con el número de repeticiones de centrifugación.

10 (1) Tasa de adquisición celular de acuerdo con la velocidad de centrifugación

- 15 Las células madre mesenquimales cultivadas (2×10^5 células / 2 ml) en el Ejemplo 1 se centrifugaron usando una centrifugadora (Hanil Science Industrial, combi514R) a 800 rpm, 1.200 rpm, 1.500 rpm y 2.000 rpm respectivamente durante 5 min. La proporción (%) de células que pasaron a través del filtro después de la centrifugación se midió estableciendo número de células que se habían cargado de filtro (2×10^5 células) como un 100 %. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

<Tabla 1>

	800 rpm, 5 min	1.200 rpm, 5 min	1.500 rpm, 5 min	2.000 rpm, 5 min
Tasa de adquisición (%)	17,9	100,0	82,1	82,1
	17,9	82,1	53,6	53,
	53,6	82,1	82,1	100,0
Promedio	29,8	88,1	72,6	78,6
Error	20,6	10,3	16,5	23,4

- 20 Como se muestra en la Tabla 1, se encontró que la centrifugación a la velocidad de 1.200 rpm dio como resultado una tasa de adquisición más elevada que otras velocidades. Basándose en los resultados que se han mencionado anteriormente, en los experimentos que siguen a continuación, la centrifugación se realizó a la velocidad de 1.200 rpm.

25 (2) Tasa de adquisición celular de acuerdo con el tiempo de duración de la centrifugación

- 30 Las células madre mesenquimales cultivadas (2×10^5 células / 2 ml) en el Ejemplo 1 se centrifugaron usando una centrifugadora (Hanil Science Industrial, combi514R) a 1.200 rpm durante 2 min, 5 min y 10 min, respectivamente, y a continuación, la proporción de células que pasaron a través del filtro se midió del mismo modo como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

<Tabla 2>

	1.200 rpm, 2 min	1.200 rpm, 5 min	1.200 rpm, 10 min
Tasa de adquisición (%)	53,6	100,0	100,0
	35,7	71,4	82,1
	100,0	71,4	53,6
Promedio	63,10	80,95	78,57
Error	33,18	16,50	23,42

- 35 Como se muestra en la Tabla 2, se encontró que la centrifugación a 1.200 rpm durante 5 min daba como resultado una tasa de adquisición de células más elevada que otros tiempos de duración. Basándose en los resultados que se han mencionado anteriormente, en los experimentos que siguen a continuación, la centrifugación se realizó a 1.200 rpm durante 5 min.

(3) Tasa de adquisición celular de acuerdo con el número de células cargadas

Las células madre mesenquimales cultivadas en el Ejemplo 1 se cargaron en el filtro a la población de 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 o 3×10^5 células / 2 ml, y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 min. A continuación, la proporción de células que pasaron a través del filtro se midió de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

<Tabla 3>

	5×10^4 células	1×10^5 células	2×10^5 células	3×10^5 células
Tasa de adquisición (%)	28,6	85,7	100,0	42,9
	57,1	85,7	71,4	37,1
	28,6	42,9	71,4	33,3
Promedio	38,10	71,43	80,95	37,76
Error	16,50	24,74	16,50	4,82

- 10 Como se muestra en la Tabla 3, se encontró que la carga de células madre mesenquimales a la población de 2×10^5 células daba como resultado una tasa de adquisición más elevada que otras poblaciones. En los experimentos que siguen a continuación, la centrifugación se realizó cargando células madre mesenquimales a la población de 2×10^5 , y a 1.200 rpm durante 5 min.

15 (4) Determinación del índice de centrifugación

Para examinar la tasa de adquisición celular de acuerdo con el índice de centrifugación, las células se dividieron en dos grupos, que se centrifugaron una vez y dos veces, respectivamente. El grupo centrifugado dos veces se dividió adicionalmente en dos subgrupos. En la segunda centrifugación de esta última, se añadió un nuevo medio de cultivo al tubo de centrifugación sin sustituir ningún filtro en el primer subgrupo, mientras que las células se suspendieron en el medio después de sustitución del filtro en el segundo subgrupo.

- 25 De forma específica, en el primer subgrupo (dos veces (adición de medio)), después de centrifugar las células madre mesenquimales una vez como se ha descrito anteriormente, se añadieron 2 ml de medio nuevo sobre el filtro usado y las células se centrifugaron. A continuación, el número de células que pasó a través del filtro se midió de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Y en el segundo subgrupo (dos veces (sustitución del filtro)), después de centrifugar las células madre mesenquimales una vez como se ha descrito anteriormente, las células se cosecharon suspendiendo las células que permanecían en el filtro. A continuación, se puso un nuevo filtro y las células se centrifugaron para medir el número de células que pasaban a través del filtro. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

<Tabla 4>

	Una vez	Dos veces (adición de medio)		Dos veces (sustitución de filtro)	
		Una vez	Dos veces	Una vez	Dos veces
Tasa de adquisición en comparación con las células cargadas (%)	73,66	75,50	0,00	88,39	0,00
	82,70	79,00	0,00		5,50
	78,57	72,10	5,80		0,00
Promedio	78,31	75,53	,33		5,50
Total	78,31	81,33		87,15	
Error	4,53	3,45	3,35	5,84	6,06

- 35 Como se muestra en la Tabla 4, los dos subgrupos centrifugados dos veces no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo centrifugado una vez. Como tal, por último se determinó que el índice de centrifugación era uno.

Después de observar las células madre mesenquimales obtenidas en las condiciones óptimas con un microscopio, se confirmó que un grupo celular uniforme que tenía un tamaño celular de 8 µm o menos se obtuvo como se muestra en la FIG. 4.

5 **Ejemplo 4: Comparación con respecto a la capacidad proliferativa de células madre mesenquimales (células pequeñas) que tienen un tamaño de 8 µm o inferior**

Para examinar la capacidad proliferativa de células pequeñas obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención, las células madre mesenquimales se dividieron en un grupo de células no aisladas (original), un grupo de células con un tamaño celular de 8 µm o menos (pequeñas), y un grupo celular con un tamaño celular que supera 8 µm (grandes), y se cultivaron compases para comparar la capacidad proliferativa. Los tres tipos de grupos de células que se han mencionado anteriormente se cultivaron en un medio de cultivo de α-MEM suplementado con FBS al 10 %, con cada pase siendo de una duración de 5 días como promedio para medir el crecimiento acumulativo.

Los resultados de la medición se muestran en la FIG. 5. La FIG. 5a muestra fotografías microscópicas de tres tipos de grupos celulares, que indican que el grupo que tiene un tamaño celular de 8 µm o menos (foto en la parte derecha) era más homogéneo en comparación con el grupo de células originales (foto en la parte izquierda) y un grupo con un tamaño celular que supera 8 µm (foto en la parte media). Las FIGs. 5b y 5c muestran capacidad proliferativa y CPD, en las que la capacidad proliferativa en el grupo que tiene un tamaño celular de 8 µm o menos era mucho mayor que la de otros grupos celulares. En particular, la CPD en el grupo con un tamaño celular de 8 µm o menos era al menos 2 veces mayor que otros dos 2 grupos.

25 **Ejemplo 5: Análisis con respecto a la Capacidad Proliferativa De acuerdo con el Porcentaje de Células Madre Mesenquimales Con un Tamaño de 8 µm o Menos (Célula Pequeña)**

Para demostrar la superioridad de la capacidad proliferativa de células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 µm o inferior (células pequeñas), se prepararon 5 tipos de grupos celulares con diferentes porcentajes de células pequeñas, como sigue a continuación.

- 30 Grupo 1: las MSC que superan 8 µm (100 %)
- Grupo 2: las MSC que superan 8 µm (75 %) + las MSC de 8 µm o menos (25 %)
- Grupo 3: las MSC que superan 8 µm (50 %) + las MSC de 8 µm o menos (50 %)
- 35 Grupo 4: las MSC que superan 8 µm (25 %) + las MSC de 8 µm o menos (75 %)
- Grupo 5: las MSC de 8 µm o menos (100 %)

La capacidad proliferativa de cada grupo celular se midió con el mismo método que en el Ejemplo 2, y la cantidad de capacidad proliferativa se presenta en la FIG. 6 como un porcentaje de aumento en comparación con el Grupo 1.

40 Como se muestra en La FIG. 6, la capacidad proliferativa más elevada de las células se observó a medida que aumentaba el porcentaje de células que tienen un tamaño de 8 µm o inferior. Estos resultados muestran que las células que tienen un tamaño de 8 µm o inferior tienen una capacidad proliferativa muy elevada.

45 **Ejemplo 6: Análisis con respecto a la Capacidad Proliferativa de Células Pequeñas De acuerdo con Condiciones de CMH**

Se sabe que la capacidad proliferativa de células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical disminuye debido a un aumento del tamaño celular cuando se cultivan en condiciones de cultivo convencionales (es decir, 37 °C y CO₂ al 5 %). Por lo tanto, es necesario establecer condiciones de cultivo en las que las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical de 8 µm o menos con una capacidad proliferativa superior puedan mantener su tamaño celular y capacidad proliferativa.

Por lo tanto, en este ejemplo, las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical que tienen un tamaño de 8 µm o inferior se cultivaron en una diversidad de condiciones, y a continuación se compararon el tamaño celular y la capacidad proliferativa en estas condiciones.

De forma específica, las células de un grupo de células originales y un grupo celular con un tamaño celular de 8 µm o menos (grupo de células pequeñas) se descongelaron y se cultivaron en una incubadora (hipoxia/incubadora con CO₂, Thermo Scientific N.º 3131) que contenía medio de cultivo de α-MEM (Invitrogen, USA) suplementado con FBS al 10 %, en la condición de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 5 días. Cuando las células alcanzaron de un 80 a un 90 % de confluencia, se obtuvieron células individuales por tratamiento con tripsina. A continuación, las células se inocularon a los medios de α-MEM a la concentración de 5000 células/cm², y se cultivaron en una condición de cultivo habitual (el grupo de control), condición de calcio (incluyendo magnesio) adicional, condición de hipoxia, y condición de calcio adicional (incluyendo magnesio)/hipóxica (en lo sucesivo en el presente documento denominada "CMH"). En el caso de una condición de cultivo habitual, las células se cultivaron en medio α-MEM (que contenía FBS al 10 %; que contenía 1,8 mM de calcio y 0,8 mM de magnesio) en la condición de 37 °C, CO₂ al 5 %, y normoxia (concentración

de oxígeno atmosférica de un 21 % (v/v)). Y en el caso de la condición de calcio (incluyendo magnesio) adicional, las células se cultivaron en el medio α -MEM cuyas concentraciones totales de calcio y magnesio se ajustaron a 3,6 mM y 1,8 mM añadiendo 1,8 mM de calcio y 1 mM de magnesio, respectivamente, en la condición de 37 °C, CO₂ al 5 %, y la normoxia. Además, en el caso de las condiciones de hipoxia, las células se cultivaron en el medio α -MEM en la condición de 37 °C, CO₂ al 5 %, e hipoxia (concentración de oxígeno de un 3 % (v/v)). En el caso de una condición de CMH, las células se cultivaron en el medio α -MEM cuyas concentraciones totales de calcio y magnesio se ajustaron a 3,6 mM y 1,8 mM añadiendo 1,8 mM de calcio y 1 mM de magnesio, respectivamente, en la condición de 37 °C, CO₂ al 5 %, y un 3 % (v/v) de oxígeno. La forma y capacidad proliferativa de las células de cada grupo se observó durante 4 rondas de pases de cultivo.

La forma (a, b) y la capacidad proliferativa (c) de las células se muestran en la FIG. 7. Como se muestra en las FIGs. 7a y 7b, se mostró que la densidad celular del grupo de células originales y el grupo de células pequeñas cultivadas en la condición de CMH era significativamente más elevada que la de los grupos cultivados en otras condiciones. Además, cuando la forma de las células del grupo de células originales y el grupo de células pequeñas se comparó, el grupo de células pequeñas tenía formas idénticas de uniones celulares y presentaba una cantidad mayor de células unidas.

Por otro lado, como se puede observar a partir de la FIG. 7c, tanto en el grupo de células de control como en el grupo de células pequeñas, se mostró que la capacidad proliferativa era mayor en la condición de CMH. En particular, la capacidad proliferativa por pase del grupo de células pequeñas era al menos 2 veces mayor que la del grupo sin células. Y los resultados con respecto a la capacidad proliferativa del grupo de células pequeñas por pase mostró que las células cultivadas en la condición de CMH presentaba una capacidad proliferativa al menos 2 veces mayor que la de las cultivadas en la condición normal.

Los resultados que se ha mencionado anteriormente indican que el grupo de células pequeñas tiene una capacidad proliferativa más elevada que la del grupo de células originales, y que el tamaño celular se puede mantener y la capacidad proliferativa de las células se puede aumentar cultivando las células pequeñas en la condición de CMH.

Ejemplo 7: Análisis con respecto al Tamaño Celular y Capacidad Proliferativa del Grupo de Células Pequeñas Cultivadas en la Condición de CMH

Para analizar el tamaño y la capacidad proliferativa de las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical del grupo de células pequeñas cultivadas en la condición de CMH, el grupo de células originales y el grupo de células pequeñas con un tamaño celular de 8 μ m o menos se cultivaron en la condición de cultivo habitual y en la condición de CMH. Las células madre mesenquimales de ese tipo se cultivaron con 2 rondas de pases (p2) en una condición de cultivo habitual antes de cultivarlas con pases en cada condición. Estas células se cultivaron durante 7 días después de cada pase. A continuación, se midieron la capacidad proliferativa y la capacidad proliferativa acumulativa de las células. Los resultados se muestran en la FIG. 8.

Como se muestra en la FIG. 8, el mantenimiento del tamaño celular y la capacidad proliferativa aumentó en gran medida cuando el grupo de células pequeñas se cultivó la condición de CMH, efecto que se mantuvo durante pases continuos. Se observó que la capacidad proliferativa era notablemente elevada durante los pases iniciales (p3 a p6) que se usan en terapia celular real. En particular, la combinación del grupo de células pequeñas y la condición de CMH mostró una diferencia de al menos 2 veces en la capacidad proliferativa por pase (FIG. 8A). En el caso de la duplicación de población acumulativa (CPD), se encontró que la capacidad proliferativa de las células se mantenía durante múltiples pases (FIG. 8B), aunque había algunas variaciones entre las MSC.

Estos resultados indican que una combinación del grupo de células pequeñas y la condición de cultivo de CMH de la presente invención es eficaz para mejorar la proliferación de células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical.

EJEMPLO 8: Capacidad Proliferativa de Células Madre Mesenquimales De acuerdo con la Concentración de Calcio

Para examinar la capacidad proliferativa de las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical de acuerdo con la concentración de calcio, las células se cultivaron en medios con diversas concentraciones de calcio.

De forma específica, las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical (MSC N.º 1) que se habían recogido de una célula madre después de administración congeladas en un estado congelado se descongelaron, y se cultivaron en una incubadora (hipoxia/incubadora con CO₂, ThermoScientific N.º 3131) que contiene medio de α -MEM (Invitrogen, USA) suplementado con FBS al 10 %, a 37 °C en una condición de CO₂ al 5 %. Cuando las células alcanzaron de un 50 a un 96 % de confluencia, se separaron en células individuales por tratamiento con tripsina. Al medio α -MEM (suplementado con FBS al 10 %; que contenía 1,8 mM de calcio y 0,8 mM de magnesio), se añadieron diversas concentraciones (0 mM, 1,6 mM, 1,8 mM, 2,0 mM, 2,2 mM, 2,4 mM y 2,6 mM) de calcio con el fin de que las concentraciones de calcio final de los medios se gustaran como sigue a continuación:

1,8 mM, 3,4 mM, 3,6 mM, 3,8 mM, 4,0 mM, 4,2 mM y 4,4 mM. Las células se cultivaron en los medios durante 6 días, y a continuación se hizo el recuento. Para evitar la precipitación inducida por calcio, se añadió magnesio a la concentración de 1 mM a cada medio (la concentración de magnesio total era 1,8 mM). Las células se cultivaron en una condición normóxica de un 21 % (v/v). Cuando las células crecieron hasta alcanzar de un 50 a un 60 %, se cultivaron compases del mismo modo. Los resultados del examen se muestran en la FIG. 9.

Como se puede observar a partir de la FIG. 9, la capacidad proliferativa aumentó con respecto a un intervalo de concentraciones de calcio adicional de 0 a 1,8 mM (concentración de calcio total de 1,8 o 3,6 mM en el medio). A partir de estos resultados, la concentración de calcio óptima para alcanzar la proliferación masiva de las células era 3,6 mM en un medio. Por lo tanto, se considera ventajoso el cultivo de células en un medio con una concentración de calcio de 1,8 a 3,6 mM con el fin de alcanzar una capacidad proliferativa mayor en comparación con una condición de cultivo habitual.

EJEMPLO 9: Capacidad Proliferativa de Células Madre Mesenquimales Obtenidas a Partir de Sangre del Cordón Umbilical De acuerdo con la Concentración de Oxígeno

Para examinar la capacidad proliferativa de las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical de acuerdo con la concentración de oxígeno, las células se cultivaron en condiciones con diversas concentraciones de oxígeno.

De forma específica, las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical (MSC N.º 1) se cultivaron del mismo modo que en el Ejemplo 8 en medio α -MEM suplementado con FBS al 10 %, pero adicionalmente no se añadieron calcio y magnesio, y las células se cultivaron con un 3 % o un 5 % de oxígeno, o en una condición normóxica (nivel de oxígeno en el aire, 21 %), y se hizo su recuento. Los resultados se muestran en la FIG. 10.

Como se muestra en los resultados, la capacidad de proliferación de las células fue superior en una condición de hipoxia que en una condición normóxica. Especialmente, la capacidad de proliferación era la más elevada en la concentración de oxígeno de un 3 %, resultado que se mantuvo a través de pases continuos durante un periodo de tiempo largo.

Ejemplo 10: Análisis con respecto a Proteína Inhibidora de la Proliferación y Senescencia de Células Madre Mesenquimales Obtenidas a Partir de Sangre del Cordón Umbilical De acuerdo con las Condiciones de Cultivo

Para identificar la causa de la mejora de la proliferación de las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical en el Ejemplo 6, se examinaron el nivel de expresión de proteína inhibidora de la proliferación en células madre y los cambios de senescencia de las mismas.

De forma específica, como se ha descrito en el Ejemplo 6, el grupo de células originales y el grupo de células pequeñas se cultivaron en la condición de cultivo habitual y en la condición de CMH. Cuando las células alcanzaron de un 50 a un 60 % de confluencia, se desprendieron por tratamiento con tripsina. Posteriormente, la solución de cultivo celular se centrifugó para retirar el medio, y después se lavó con PBS para obtener células. A continuación, la proteína se aisló de las células usando un tampón de lisis (RIPA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La proteína se cuantificó usando albúmina de suero bovino (BSA) como un patrón, y se prepararon 15 μ g de la proteína para realizar la transferencia de Western. La proteína se cargó sobre gel de poliacrilamida al 12 %, y a continuación se sometió a electroforesis a 130 V durante 2 horas. Después de la electroforesis, la proteína se transfirió desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia, USA) con una corriente de 300 mA durante 3 horas usando aparato de Transferencia de Western, y la membrana se bloqueó durante 1 hora usando una solución 1X de TBST (100 mM Tris (pH 7,5), NaCl 1,5 M, Tween-20 al 0,5 %) que contenía leche sin grasa al 5 %. A continuación, los anticuerpos primarios (p21, p53 (Abeam, USA) y β -actina) se unieron a la membrana de nitrocelulosa bloqueada, a una temperatura de refrigeración durante una noche. A partir de ese momento, la membrana de nitrocelulosa resultante se lavó con 1X de TBST, y anticuerpos secundarios (IgG-HRP anti-conejo o ratón, Cell Signaling Technology, MA, USA) se añadieron y se permitió que se unieran a la misma durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la solución de cebado de ECL se vertió en la membrana usando el kit de detección de transferencia puntual de Western de ECL (Amersham Pharmacia) de acuerdo con el protocolo del fabricante y las bandas se examinaron con el equipo Chemidoc (Biorad, USA).

Los resultados de la transferencia de Western se muestran en la FIG. 11. Como se muestra en la FIG. 11, se encontró que los niveles de expresión de p53 y p21 (Abcam), proteínas inhibidoras de la proliferación, eran relativamente bajos en el grupo de células pequeñas que se habían cultivado en la condición de CMH. Este resultado indica que la condición de cultivo de CMH mejora la capacidad proliferativa de las células madre mesenquimales mediante regulación negativa de la expresión de las proteínas inhibidoras de la proliferación.

Al mismo tiempo, las células del grupo de células originales y el grupo de células pequeñas se cultivaron con varios pases en la condición de cultivo habitual y la condición de CMH para inducir la senescencia de las mismas. La

solución de cultivo se retiró de cada recipiente de cultivo y las células se lavaron una de con PBS. A continuación, después de añadir 1 ml de 1X de solución de fijación (Cell Signaling Technology) a esto, las células se cultivaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de fijación, las células se lavaron dos veces con 2 ml de PBS. A continuación, después de añadir 1 ml de una solución de tinción de β -galactosidasa (SA β gal, Cell Signaling Technology) a esto, las células se cultivaron en una incubadora de 24 a 48 horas. Y a continuación, después de retirar la solución de tinción, las células se lavaron con 1 ml de PBS. A continuación, las células teñidas se fotografiaron usando un microscopio inverso ECLIPSE TE2000-U (Nikon) a 100X de aumento. Las fotografías se usaron para examinar el recuento de células teñidas con respecto al recuento de células totales.

Los resultados del examen se proporcionan en la FIG. 12A y en la FIG. 12B. La FIG. 12A y la FIG. 12B (parte izquierda) proporcionan fotografías del grupo de células originales y el grupo de células pequeñas de las MSC (las MSC N.º 1 a N.º 4) obtenidas a partir de diferentes células madre que las habían producido, que se cultivaron en la condición de cultivo habitual y en la condición de CMH. Las fotografías muestran las células envejecidas teñidas. Además, las FIGs. 12A y 12B (parte derecha) proporcionan gráficos que muestran la proporción del recuento de células teñidas con respecto al recuento de células totales. En los gráficos, Original (O) se refiere a un grupo de células originales, OCMH se refiere a un grupo de células originales cultivadas en la condición de CMH, S se refiere a un grupo de células pequeñas cultivadas en la condición de cultivo convencional, y SCMH a un grupo de células pequeñas cultivadas en la condición de CMH.

Como se muestra en la FIG. 12A y en la FIG. 12B, el número de zonas envejecidas era el menor cuando las células pequeñas se cultivaron en la condición de CMH, tal como se confirman los gráficos. Estos resultados indican que la capacidad proliferativa puede aumentar y la senescencia se puede suprimir cultivando células pequeñas de la presente invención en la condición de CMH.

Ejemplo 11: Examen de Cambios en el Potencial de Diferenciación y Marcadores de Células Madre Mesenquimales Obtenidas a Partir de Sangre del Cordón Umbilical De acuerdo con las Condiciones de Cultivo

Con el fin de examinar las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical para cualquier cambio en sus características básicas cuando las células pequeñas de acuerdo con la presente invención se cultivan en la condición de CMH, el grupo de células originales y el grupo de células pequeñas de dos tipos de células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical se cultivaron en la condición de cultivo convencional y la condición de cultivo de CMH. El análisis se realizó para comprobar cualquier cambio en los potenciales de diferenciación de las células madre mesenquimales en inducciones osteogénicas y adipogénicas, y cambios en los marcadores de etiquetado de las mismas.

<11-1> Inducción osteogénica y tinción ósea

Para la inducción de diferenciación osteogénica, se colocaron 500-1000 células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos, y el medio de inducción osteogénico (fosfato de glicerol 10 mM, ácido L-ascórbico-2-fosfato 50 mM, dexametasona/UVAB 1 μ M, medio de α -MEM suplementado con gentamicina y FBS al 10 %) se proporcionó después de 2-4 días. El medio se reemplazó con nuevo medio de diferenciación cada 3 días para inducir la diferenciación de las células durante 2-3 semanas. Las células diferenciadas se lavaron dos veces con PBS y a continuación se incubaron en una solución de fijación (acetona al 40 %) de 30 a 45 segundos. Después de lavar las células 2-3 veces con agua destilada, una solución de tinción alcalina (sal de violeta B rápida) se añadió a esto, y las células se cultivaron en un lugar oscuro a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación las células se lavaron dos veces con agua destilada, y se trataron con solución de Hematoxilina de Mayer de 10 a 20 segundos. Después de retirar la solución, las células se lavaron con agua corriente y se secaron. Los tejidos teñidos se cubrieron con un cubreobjetos a la vez que se usaba una solución acuosa de montaje para observación. Dado que las células diferenciadas en osteoblastos se tiñen de color marrón oscuro debido a la activación de la fosfatasa alcalina intra-celular, el grado de inducción osteogénica de las células se evaluó basándose en el grado de tinción.

<11-2> Inducción adipogénica y tinción de grasa

Para inducción adipogénica, se colocaron 500-1000 células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos, y un medio de inducción adipogénico (3-isobutil-1-metil xantina 0,5 mM, indometacina 0,2 mM, insulina 10 μ M, dexametasona/UVAB 1 μ M, y se proporcionó medio DMEM suplementado con FBS al 10 % y gentamicina) después de 2-4 días. El medio se reemplazó con nuevo medio de diferenciación cada 3 días para inducir la diferenciación durante 3-4 semanas. Las células diferenciadas se lavaron dos veces con PBS y a continuación se incubaron en una solución de fijación (formalina al 10 %) durante 10 min. Después de lavar las células 2-3 veces con agua destilada, una solución de tinción (rojo aceite O) se añadió a esto, y las células se colocaron a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, las células se lavaron con agua destilada y se trataron con solución de Hematoxilina de Mayer de 10 a 20 segundos. Después de retirar la solución, las células se lavaron con agua corriente y se secaron. Los tejidos teñidos se observaron, se cubrieron con un cubreobjetos a la vez que se usaba una solución acuosa de montaje. El grado de inducción adipogénica se evaluó basándose en el grado de tinción (de color rojo), y presencia y grado de formación de vacuolas lipídicas diferenciadas.

Los resultados experimentales se muestran en la FIG. 13. La FIG. 13a y la FIG. 13b muestran resultados de inducción osteogénica e inducción adipogénica, respectivamente. Como se muestra en la FIG. 13, se obtuvieron resultados superiores en inducción osteogénica e inducción adipogénica cuando el grupo de células pequeñas se cultivó en la condición de CMH. Los resultados mencionados anteriormente sugieren que la combinación de tamaño celular pequeño y condición de cultivo de CMH pueden mejorar el potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical.

<11-3> Análisis de marcadores

Con el fin de analizar el inmunofenotipo de antígenos de superficie celular en células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical, la expresión de proteínas marcadoras (CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, HLAABC, y HLADR) se examinó mediante análisis FACS como sigue a continuación.

El grupo de células originales y el grupo de células pequeñas se cultivaron en la condición de cultivo convencional en la condición de CMH. A continuación, las células se trataron con tripsina y se lavaron dos veces con solución de PBS. Se hizo que las células lavadas reaccionaran con CD14-FITC (isotiocianato de fluoresceína), CD34-FITC, CD45-FITC y HLADR FITC, antígenos negativos conocidos en células madre mesenquimales, y con CD73-PE (ficoeritrina), CD90-PE, CD105-PE, y HLAABC-PE, antígenos positivos conocidos fuertemente expresados en células madre mesenquimales. La proporción de células que expresan los marcadores con respecto a las células totales se obtuvo detectando señales de anticuerpos secundarios mediante máquina de FACS. El análisis después de la reacción se realizó usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y el software CELLQUEST.

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5.

<Tabla 5>

Marcador	CD14	CD34	CD45	HLADR	CD29	CD44	CD90	CD 105	HLAABC
Grupo de células originales + Cultivo convencional	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Grupo de células pequeñas + Cultivo convencional	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Grupo de células originales + Cultivo de CMH	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Grupo de células pequeñas + Cultivo de CMH	-	-	-	-	+	+	+	+	+

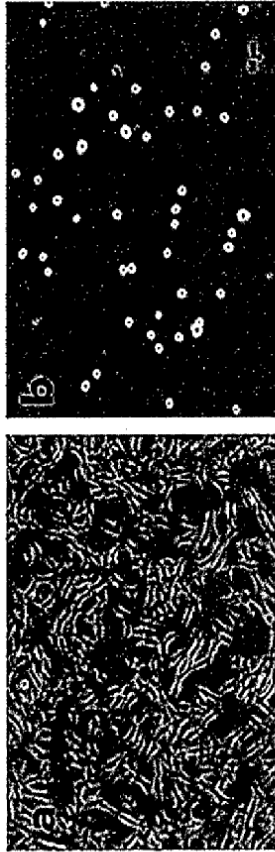
Como se muestra en la Tabla 5, no hubo diferencia en las expresiones de proteínas marcadoras en células madre mesenquimales de acuerdo con el tamaño celular o las condiciones de cultivo.

Los resultados desvelan que las células pequeñas y la condición de cultivo de CMH de la presente invención no cambian de forma significativa las características básicas de células madre mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cultivar células madre mesenquimales, que comprende las etapas de:
 - 5 (1) aislar células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior; y
 - (2) cultivar las células madre mesenquimales en un medio que contiene de 2,1 a 3,8 mM de calcio y de 1,0 a 3,0 mM de magnesio en una condición de un 2 a un 5 % de oxígeno, en el que el aislamiento no comprende métodos para tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y no comprende métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que las células madre mesenquimales se obtienen a partir de sangre del cordón umbilical, médula ósea, lípido, músculo, piel, líquido amniótico, cordón umbilical, o diente.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que el aislamiento de las células madre mesenquimales de la etapa (1) se realiza pasando las células madre mesenquimales a través de una membrana de filtración con un tamaño de poro de 8 μm .
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que el medio se selecciona entre el grupo que consiste en medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM), medio mínimo esencial (MEM), α -MEM, medio 5A de McCoys, medio basal de Eagle, medio del Connaught Medical Research Laboratory (CMRL), MEM de Glasgow, medio F-12 de Ham, medio de Dulbecco modificado con Iscove (IMDM), medio L-15 de Leibovitz, medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), medio 199, y medio 199 de Hank.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que el medio comprende de un 5 a un 30 % de suero bovino fetal.
6. El método de la reivindicación 4, en el que el medio no comprende suero bovino fetal sino una sustitución de suero.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en el que el medio se basa en un α -MEM suplementado con un 5 a un 30 % de suero bovino fetal, de 0,3 a 2,0 mM de calcio, y de 0,2 a 2,2 mM de magnesio.
8. El método de la reivindicación 1, en el que las células madre mesenquimales cultivadas se subcultivan en las mismas condiciones de cultivo que se han descrito en la reivindicación 1.
- 35 9. Un método para mejorar la capacidad proliferativa y el potencial de diferenciación de células madre mesenquimales, que comprende las etapas de:
 - 40 (1) aislar células madre mesenquimales que tienen un tamaño de 8 μm o inferior; y
 - (2) cultivar las células madre mesenquimales aisladas en un medio que contiene de 2,1 a 3,8 mM de calcio y de 1,0 a 3,0 mM de magnesio en una condición de un 2 a un 5 % de oxígeno, en el que el aislamiento no comprende métodos para tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y no comprende métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal.

FIG. 1



C

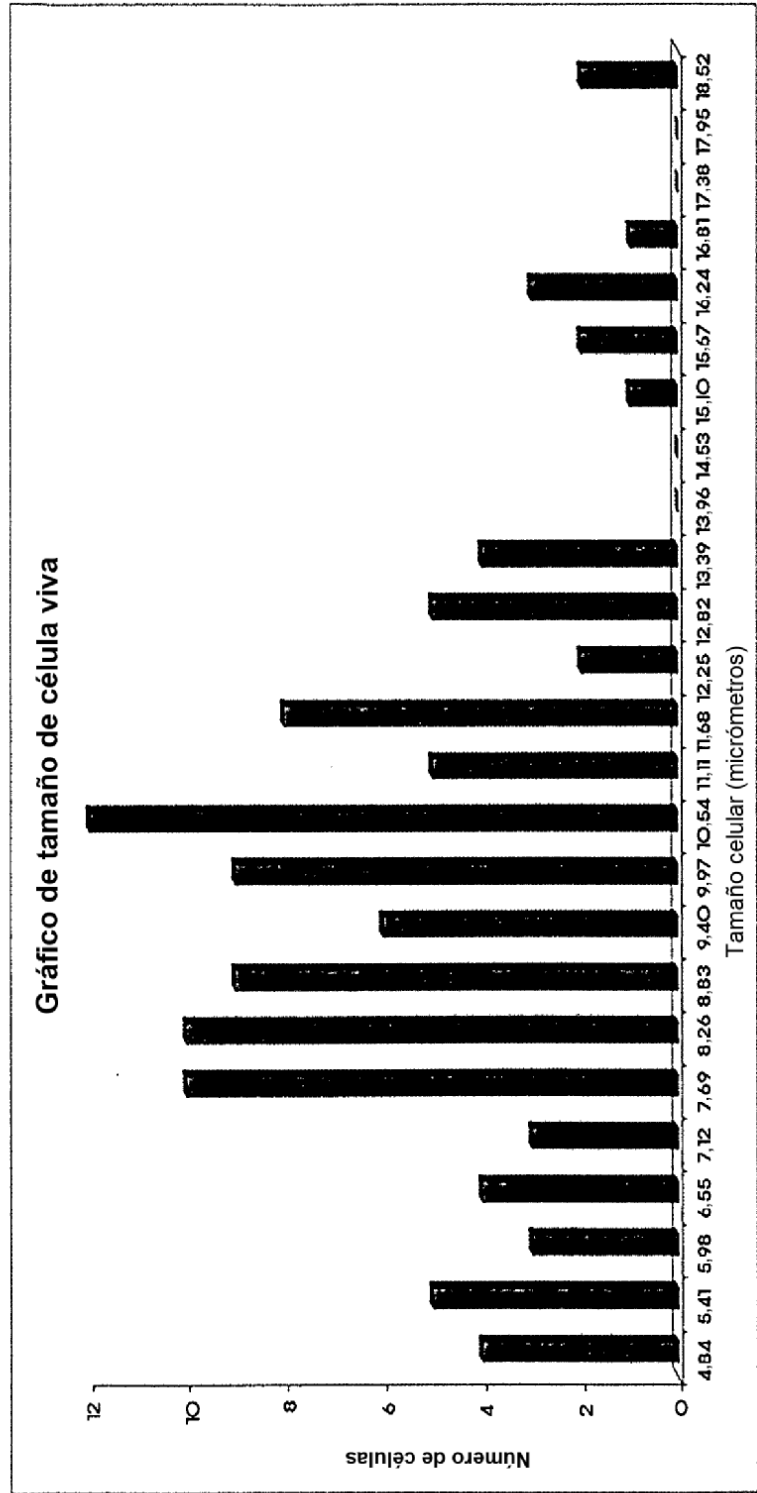


FIG. 2A

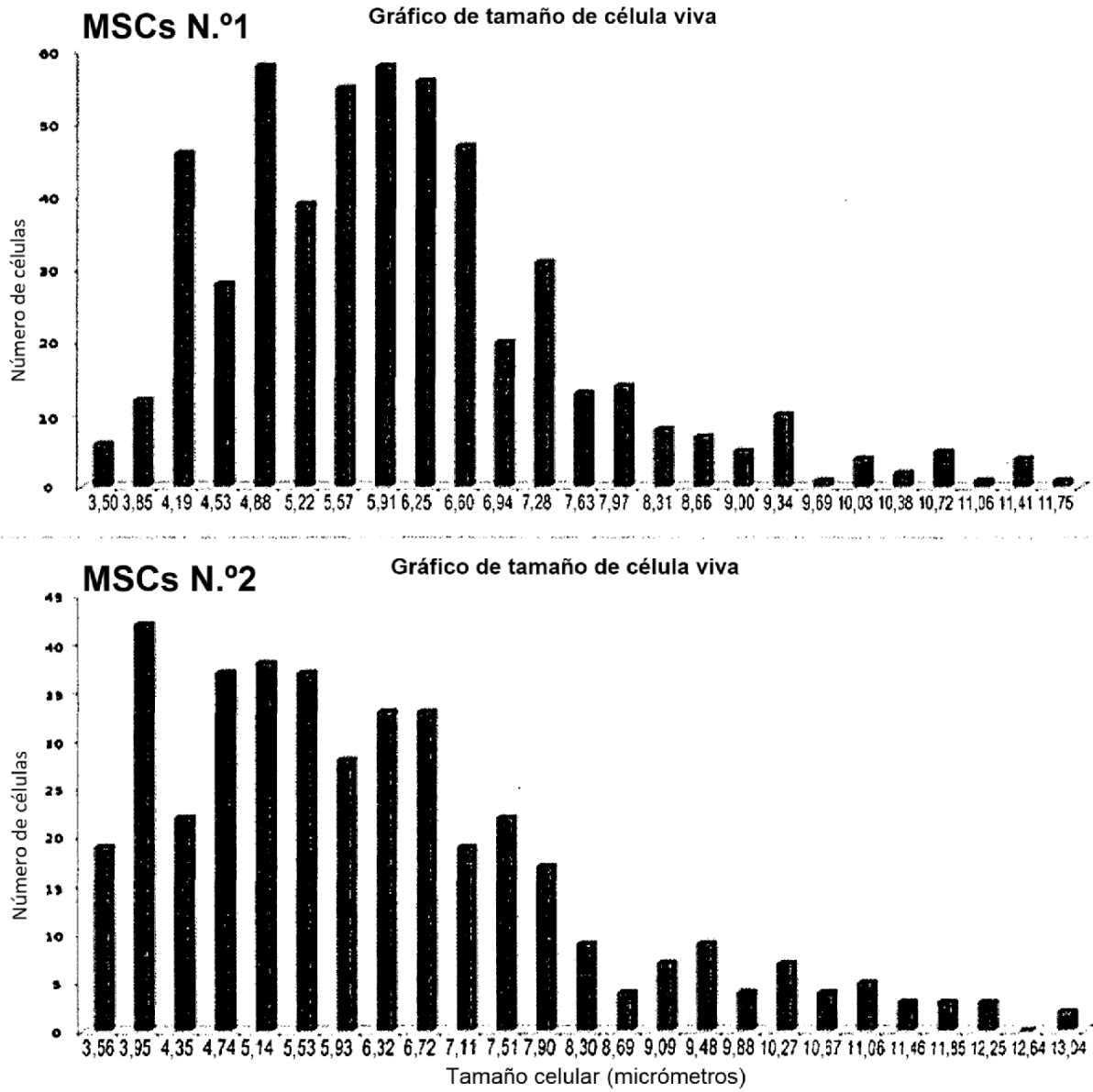


FIG. 2B

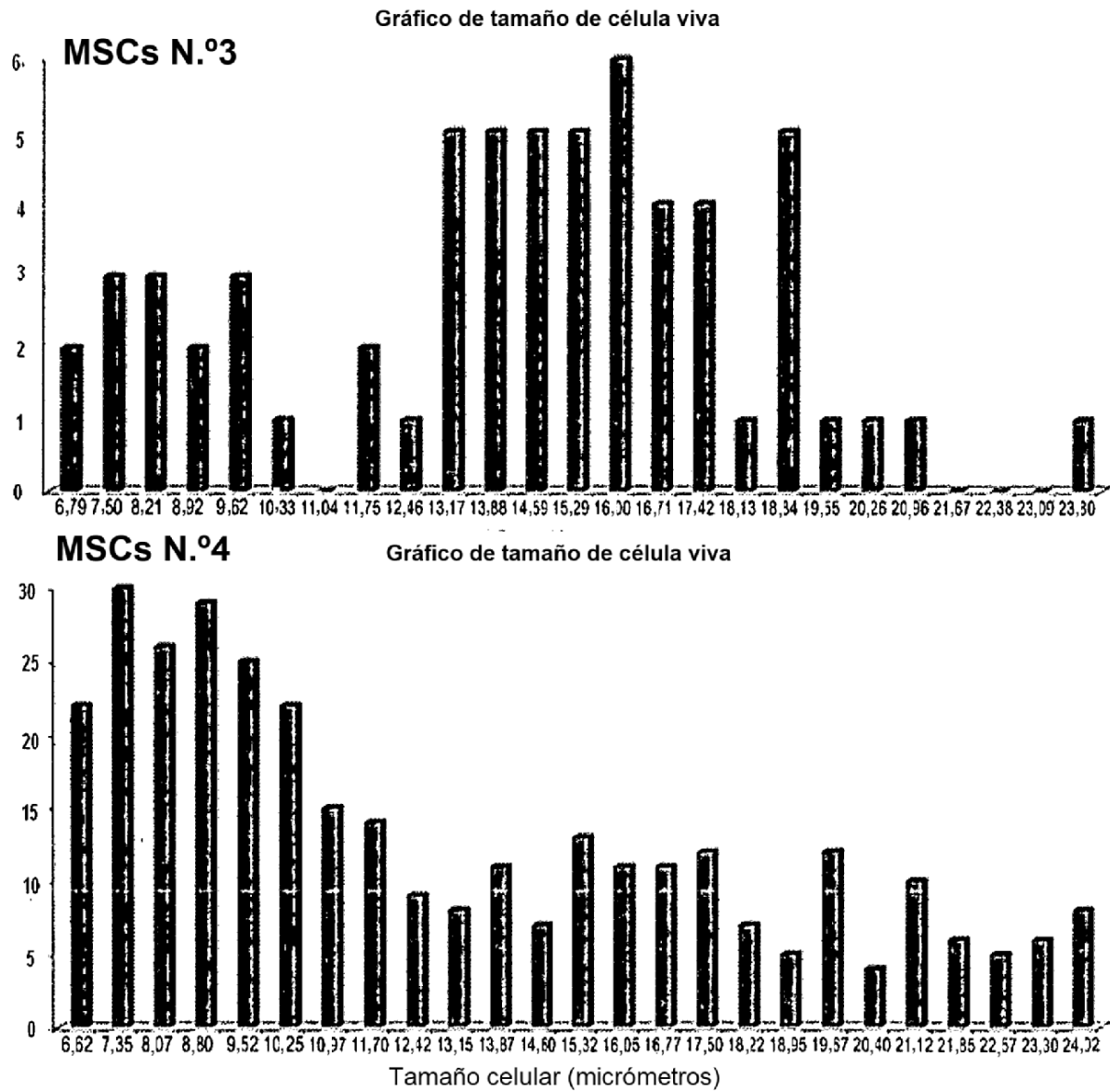


FIG.3

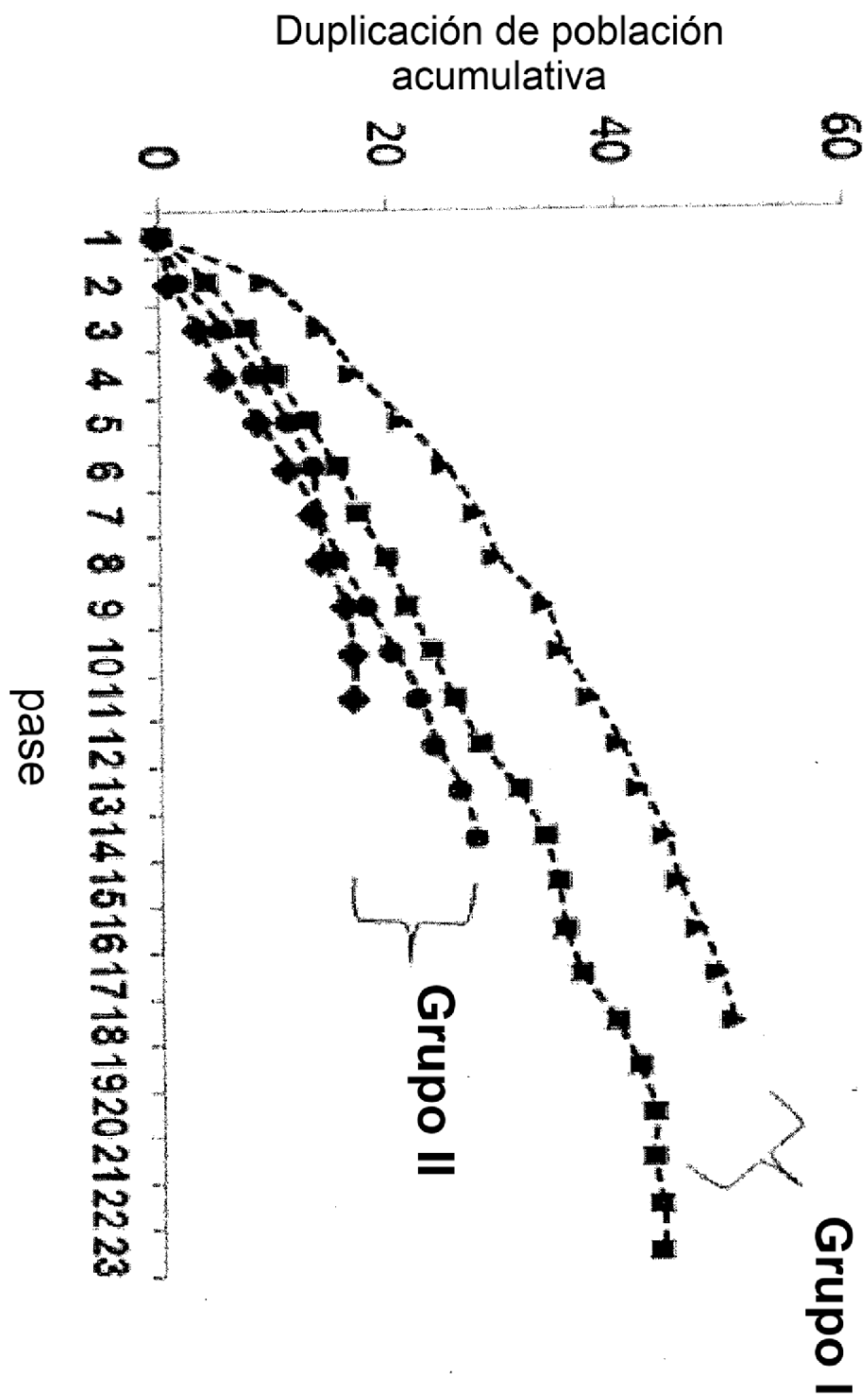


FIG. 4

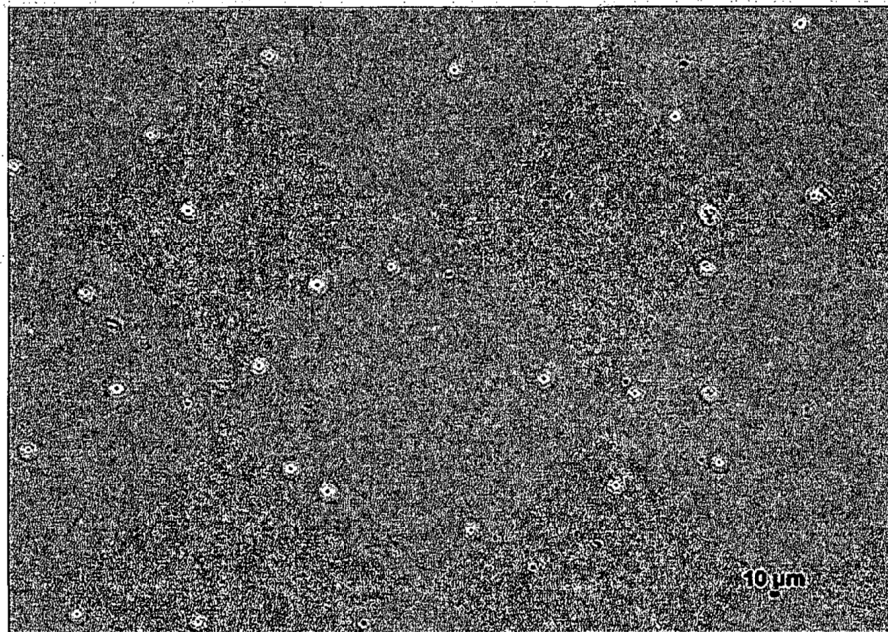
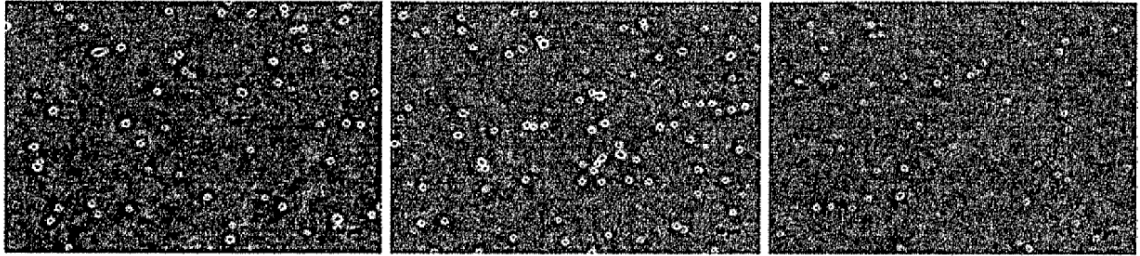
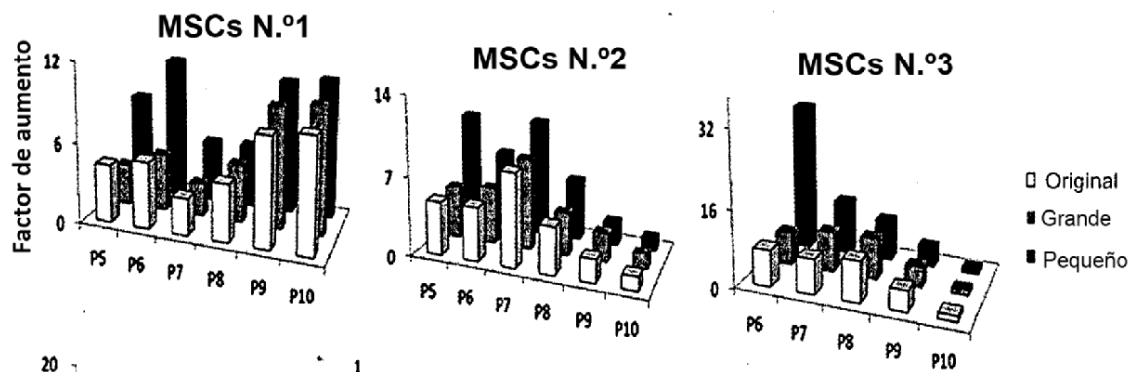


FIG. 5

a



b



c

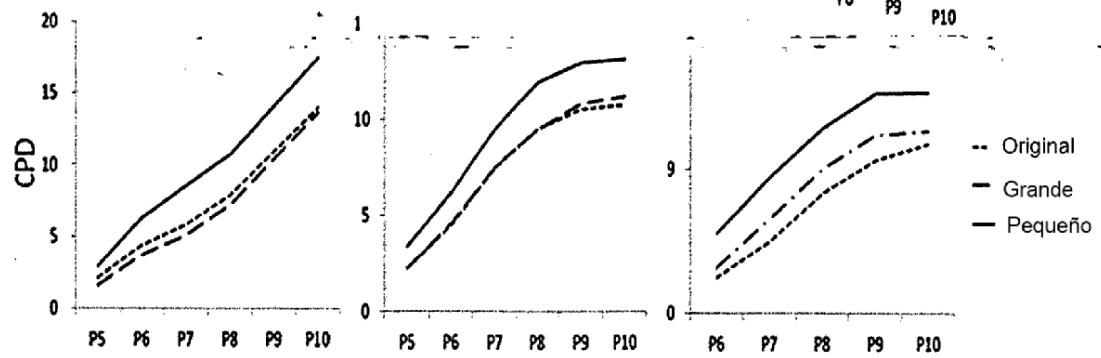


FIG. 6

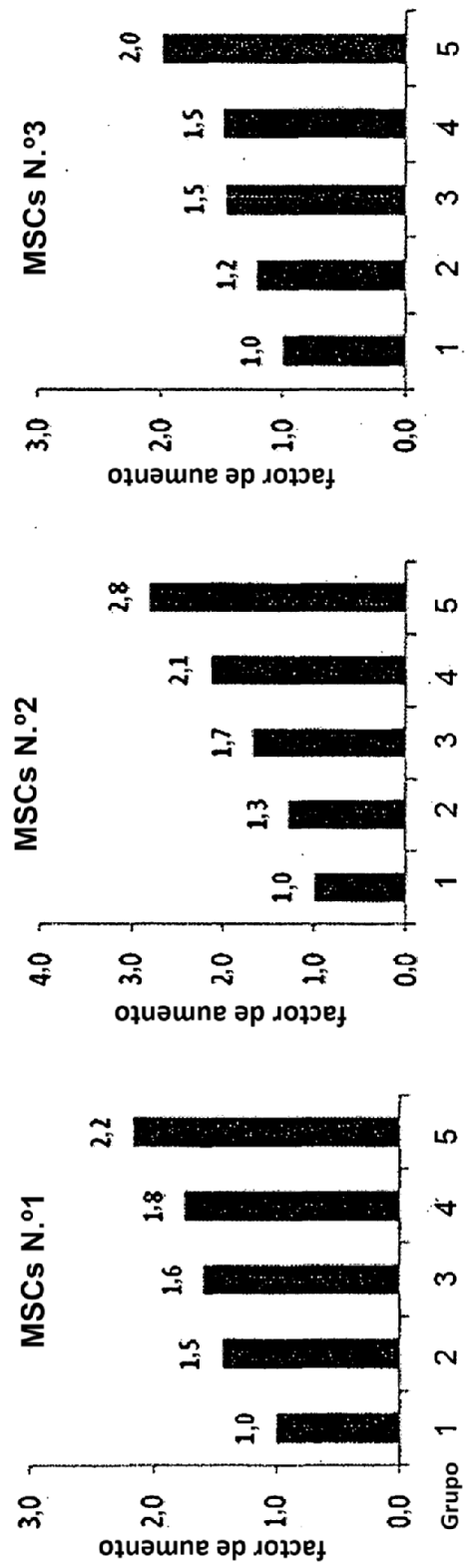


FIG. 7

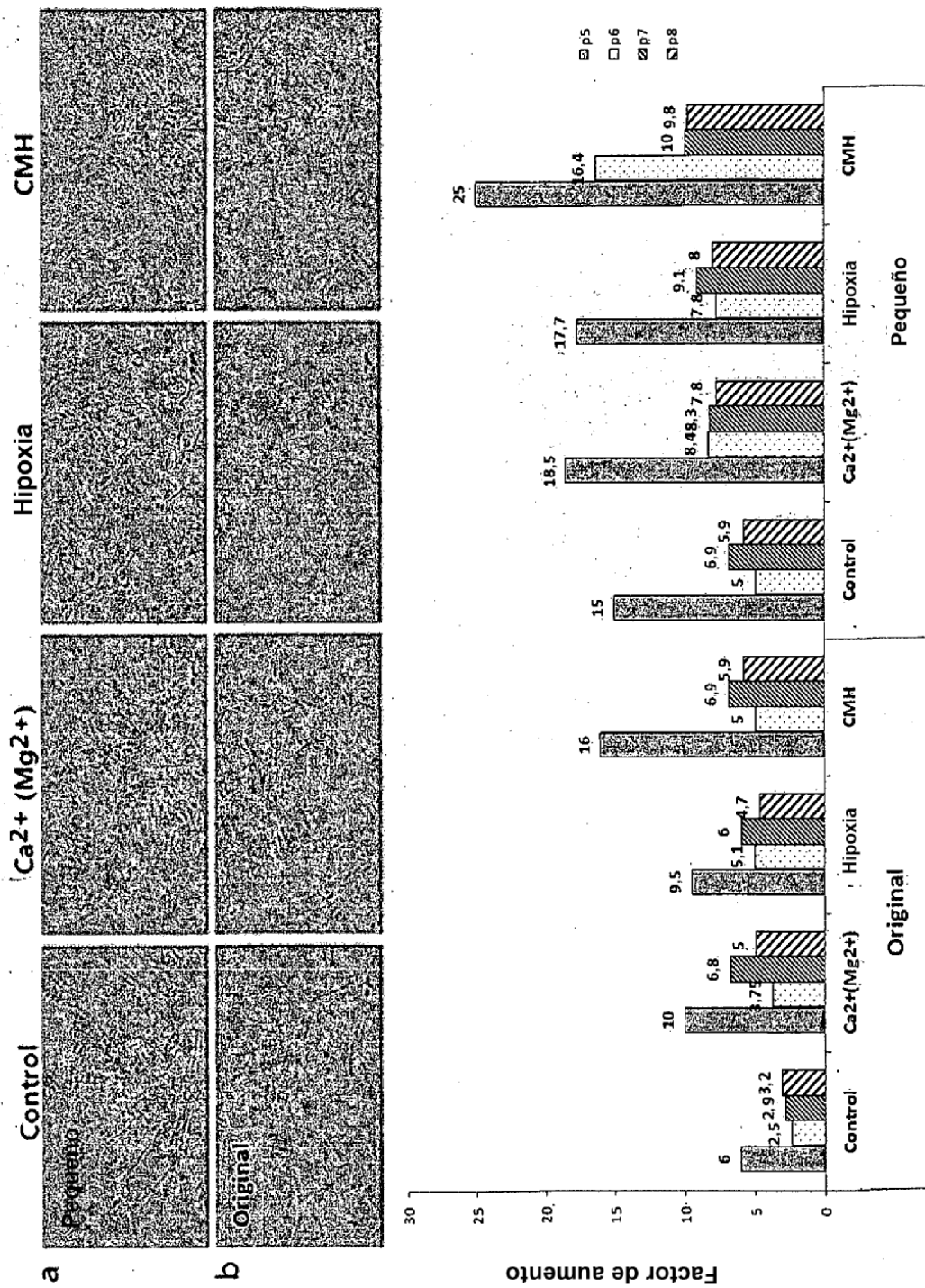


FIG. 8A

Crecimiento celular (n = 4)

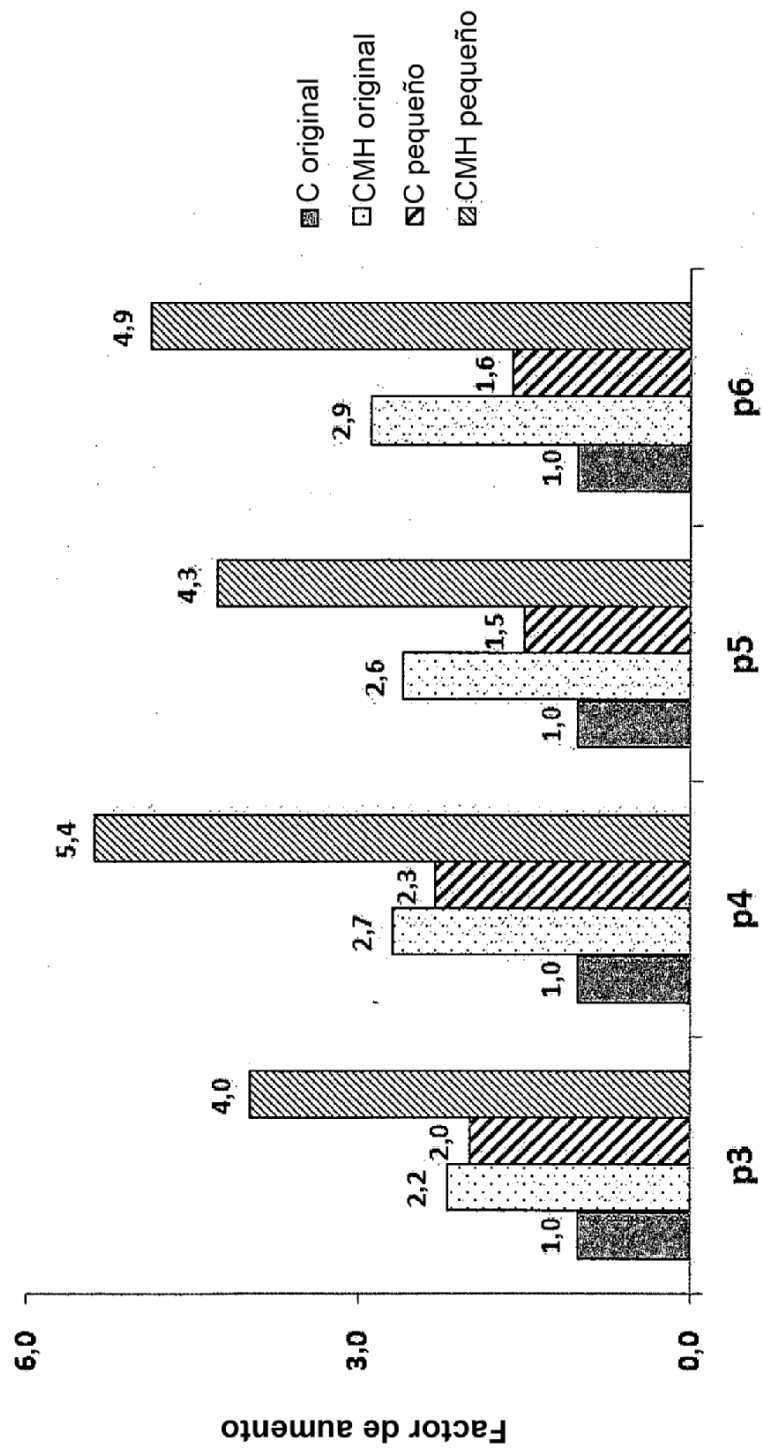


FIG. 8B

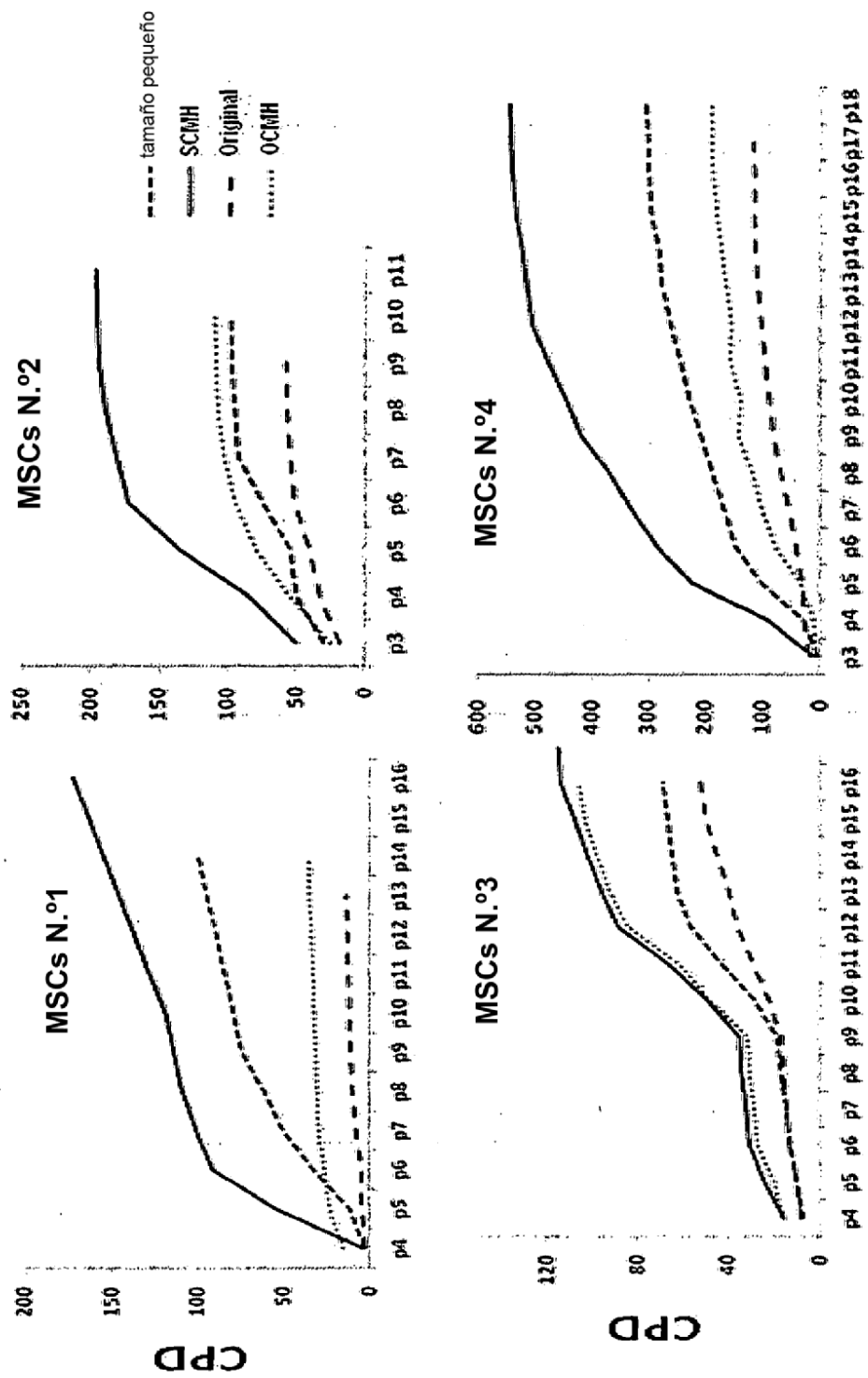


FIG. 9

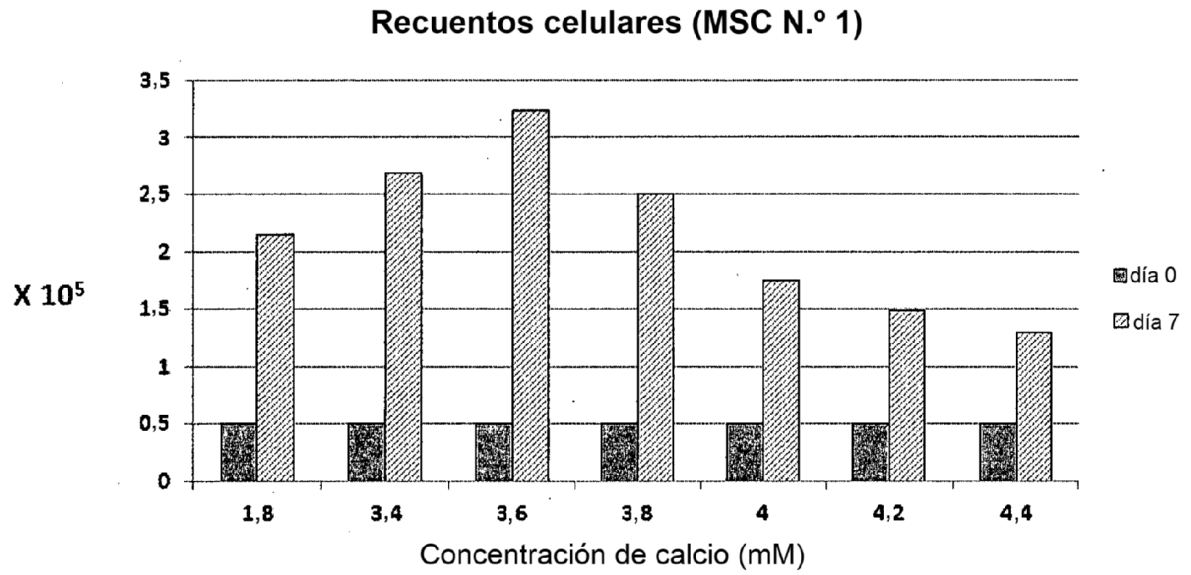


FIG. 10

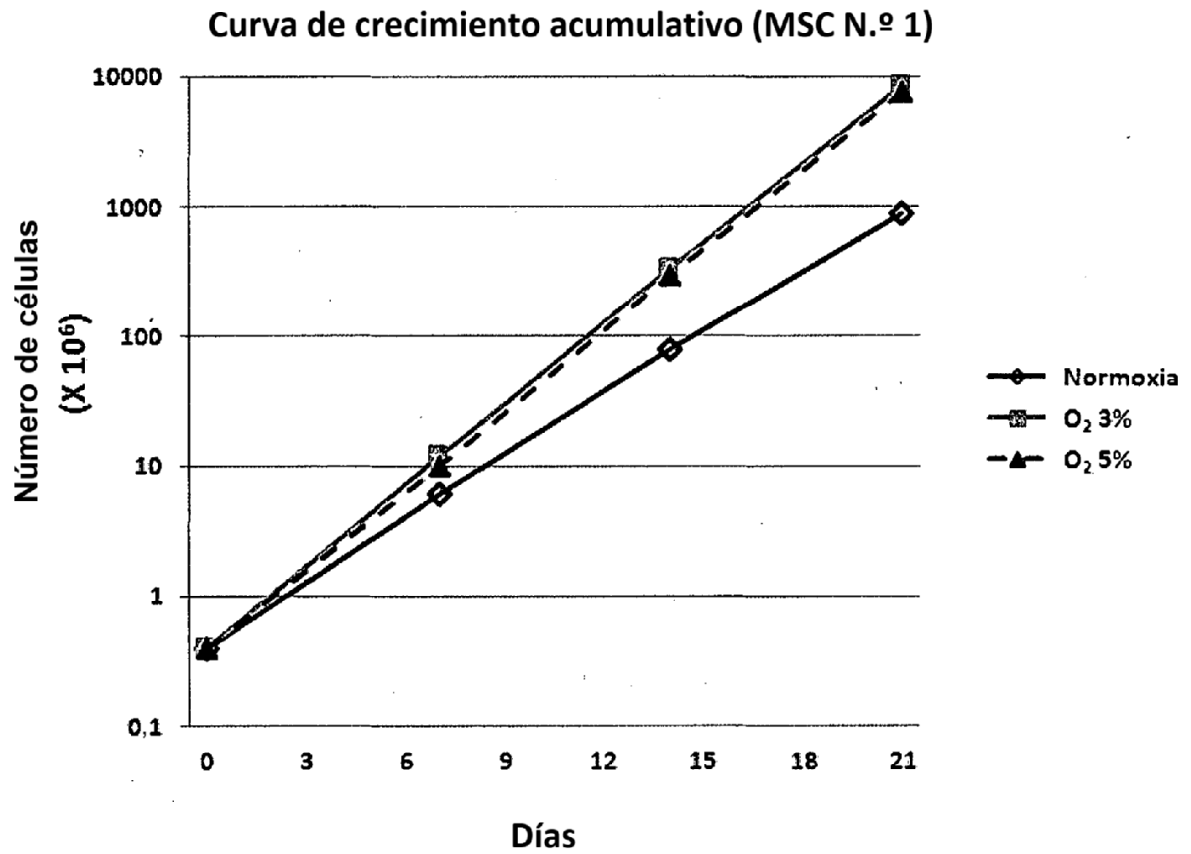


FIG. 11

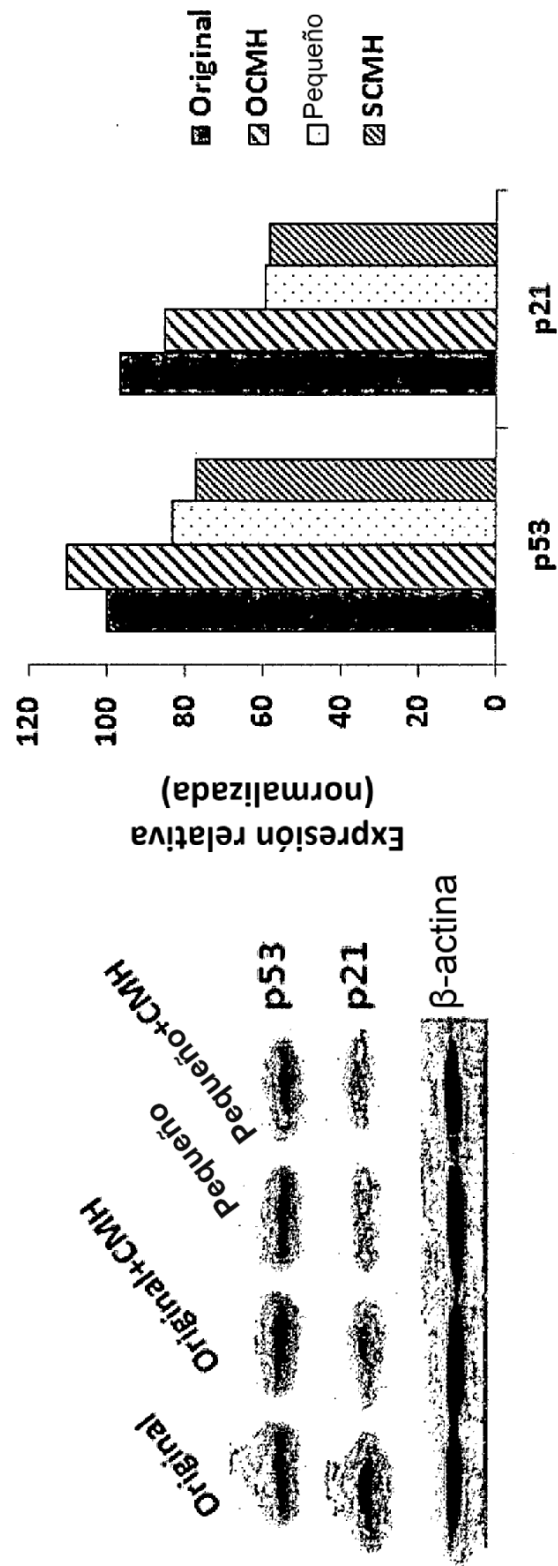


FIG. 12A

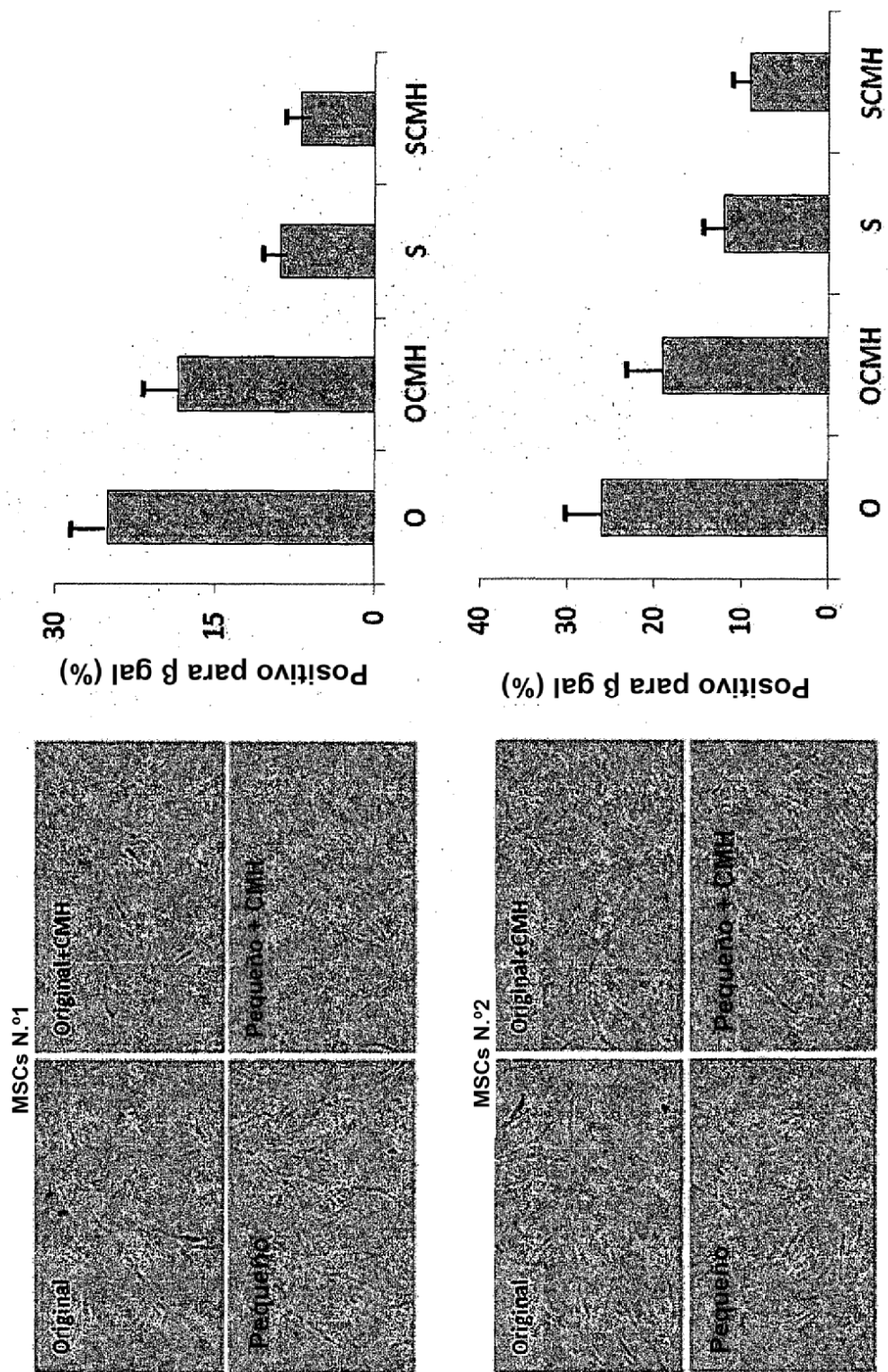


FIG. 12B

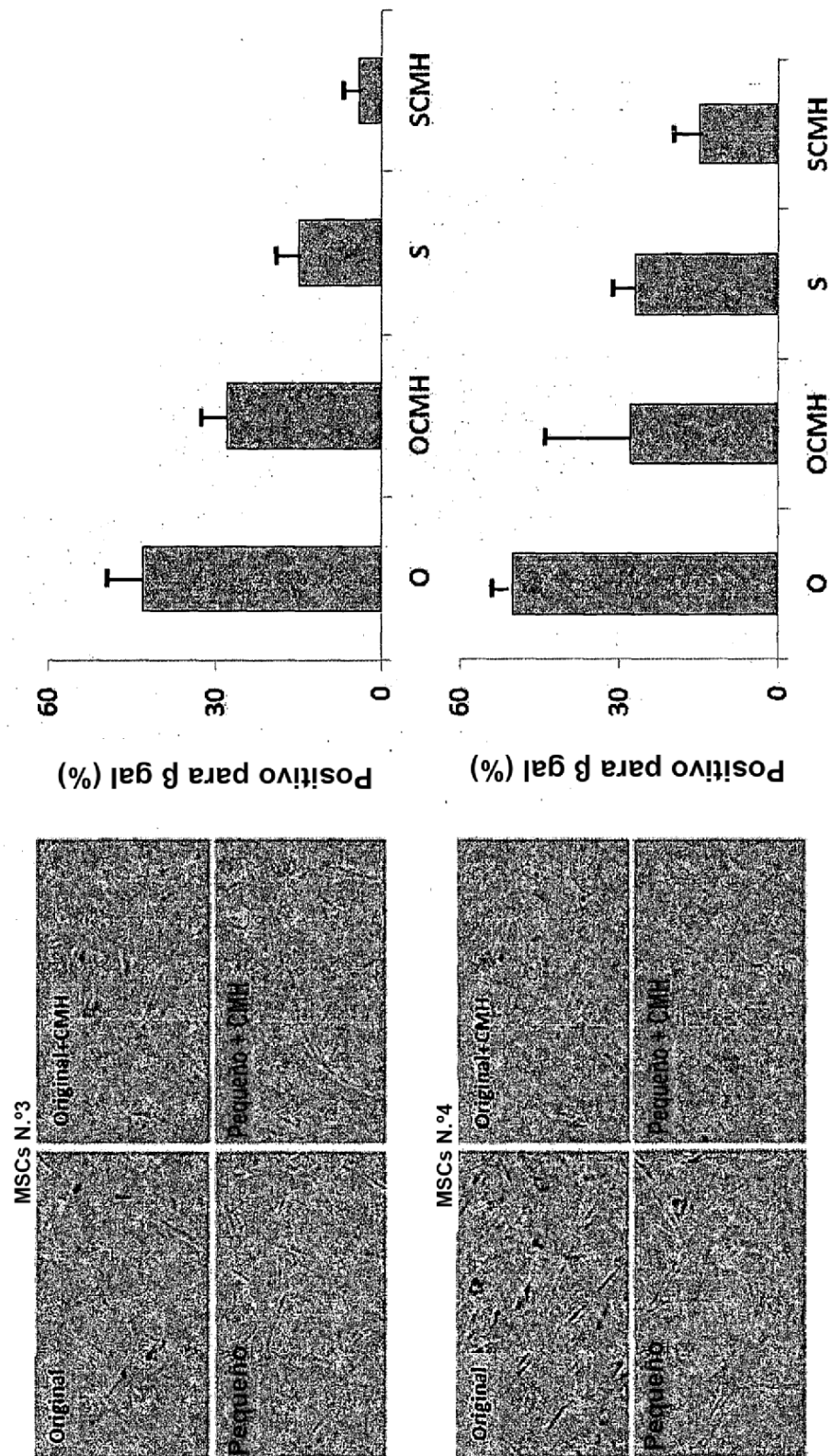


FIG. 13

