(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 722 930**

(51) Int. CI.:

C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/07 (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2010 PCT/KR2010/001338**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010 WO10107192**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2010 E 10753642 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2410046**

(54) Título: **Procedimiento de aislamiento para células madre pluripotentes derivadas de sangre umbilical que expresan ZNF281**

(30) Prioridad:

20.03.2009 KR 20090023821

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.08.2019

(73) Titular/es:

SNU R&DB FOUNDATION (100.0%)
San 56-1 Sillim-dong, Gwanak-gu
Seoul 151-742, KR

(72) Inventor/es:

KANG, KYUNG SUN y
ROH, KYOUNG HWAN

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de aislamiento para células madre pluripotentes derivadas de sangre umbilical que expresan ZNF281

Campo Técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para aislar células madre pluripotentes/multipotentes que expresan ZNF281 derivadas de sangre de cordón umbilical, caracterizado por el cultivo de células mononucleares aisladas de sangre de cordón umbilical en un recipiente de cultivo recubierto con fibronectina y luego recolectar células madre del cultivo, en donde las células madre se encuentran en un estado indiferenciado, aisladas de ese modo las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical. La presente invención también se refiere al uso de un nuevo medio de cultivo para células madre, un procedimiento de cultivo para células madre que se caracteriza por cultivar y hacer proliferar células madre en el medio de cultivo, y un procedimiento para aumentar la capacidad como células troncales de las células madre que se caracteriza por un cultivo en esfera o un cultivo tridimensional de células madre.

Técnica antecedente

Las células madre, caracterizadas por su autorrenovación, su diferenciación y por ser inmortales, se han propuesto como solución para los problemas de la medicina regenerativa y el reemplazo de tejidos de hueso que puedan usarse para tratar diversas enfermedades degenerativas, así como para proporcionar una visión profunda en la biología celular. Las células madre adultas, que se pueden obtener a partir de diversos tejidos, son mucho más atractivas que las células madre embrionarias debido a la capacidad de provenir de un número ilimitado de fuentes, y las objeciones éticas de usar embriones humanos como fuente de células se hacen irrelevantes. Además, las células madre aisladas de la sangre de cordón umbilical tienen ventajas sobre otras células madre adultas, ya que los donantes de la sangre de cordón umbilical no son lastimados, a diferencia de los donantes de médula ósea o tejido adiposo.

Las células madre mesenquimales derivadas de la sangre de cordón umbilical se han introducido con éxito en diversos tipos de células, incluidas las células neurales, hepatocitos, osteocitos, etc., *in vitro* (Sun, W. et al., Stem cells, 23:931, 2005; Hong SH. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 30:1153, 2005; Hutson EL. et al., Tissue Engineering, 11:1407, 2005). También se informó sobre el éxito del trasplante in vivo de células madre mesenquimales derivadas de la sangre de cordón umbilical para lesiones, diabetes mellitus e infarto cardíaco (Nonome, K. et al., Am, J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 289:1091, 2005; Yoshida, S. et al., Stem cells, 23:1409, 2005; Kim Bo. et al., Circulation, 112:96, 2005). Debido a la baja posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas y la baja posibilidad de causar enfermedades de injerto-versus-huésped, el trasplante de células madre mesenquimales derivadas de la sangre de cordón umbilical se ha aplicado cada vez más a pacientes tanto infantiles como adultos (Claudio G. B. et al., Annual Review of Medicine, 57:403, 2006). Aunque el trasplante de sangre de cordón umbilical ha sido aceptado como una terapia para algunas enfermedades, particularmente las enfermedades relacionadas con la defección hematopoyética (Grewal, SS. et al., Blood, 103:1147, 2004; Knutsen, AP. et al., Journal pediatrics, 142:519, 2003; Ooi, J. et al., Blood, 103:489, 2004; Sanz GF. et al., Blood, 103:489, 2004), los estudios sobre la aplicación clínica de células del tronco mesenquimal derivado de la sangre de cordón umbilical todavía son limitados. Por ejemplo, hay informes sobre el uso de células madre para curar con éxito, no de forma total sino parcial, a mujeres con lesiones de la médula espinal y pacientes con enfermedad de Buerger (Kim, SW. et al., Stem Cells, 2006; Kang, KS. et al., Cytotherapy, 7:368, 2005). Sin embargo, el mecanismo de desarrollo de las células o cómo hacerlas crecer y proliferar sigue siendo desconocido.

ZHAO ET AL: "Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 312, no. 13, 1 Augosto 2006, pags. 2454-2464, XP005541900 describe células madre de la sangre de cordón umbilical que muestran importantes características de células madre embrionarias, incluida la expresión de marcadores moleculares específicos de células madre embrionarias, incluidos los factores de transcripción OCT-4 y Nanog a lo largo de los antígenos embrionarios-específicos de la etapa.

KOGLER GESINE ET AL: "A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 200, no. 2, 19 Julio 2004, pags. 123-135, XP002559665, describe una población intrínsecamente pluripotente negativa a CD45 de sangre de cordón humano denominada células madre somáticas no restringidas.

Es difícil aislar las células madre mesenquimales de la sangre de cordón umbilical. Por ejemplo, cuando el procedimiento utilizado para aislar células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea se aplica a la sangre de cordón umbilical, la tasa de aislamiento se mantiene en alrededor del 20%. Hasta el 50% de las células madre mesenquimales se pueden aislar de la sangre de carne que se tomó 5 horas antes del aislamiento. Sin embargo, la tasa de aislamiento se reduce al 20% o menos cuando la sangre se ha extraído más de 5 horas antes de realizar el aislamiento y las células, aunque aisladas, no proliferan bien.

Divulgación

Problema Técnico

Como parte de la presente invención, una investigación intensiva y exhaustiva sobre el aislamiento y la proliferación masiva de células madre de la sangre de cordón umbilical, realizada por los presentes inventores, dio como resultado el descubrimiento de que cuando se cultivan en presencia de fibronectina, las células mononucleares aisladas de la sangre de cordón umbilical humano proliferan altamente y forman colonias, exhibiendo una morfología en forma de huso, y mantienen las propiedades de las células madre incluso después de muchos pasajes. Por lo tanto, según el hallazgo, se proporciona un procedimiento para aislar eficazmente las células madre pluripotentes/multipotentes no-hematopoyéticas derivadas de la sangre de cordón umbilical y las células madre mesenquimales y para su proliferación en masa.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para aislar células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical, que comprende cultivar células mononucleares aisladas de la sangre de cordón umbilical en presencia de fibronectina y recuperar células madre del cultivo, en donde la célula madre está en un estado indiferenciado.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical aisladas mediante el procedimiento de aislamiento.

Todavía es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un nuevo uso de un medio de cultivo para células madre.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un procedimiento para cultivar células madre, usando el medio de cultivo.

Es un procedimiento para aumentar el tallo de las células madre, utilizando un cultivo de esfera o un cultivo tridimensional de células madre.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la misma, la presente invención se refiere a un procedimiento para aislar células madre pluripotentes o multipotentes derivadas de sangre de cordón umbilical que expresan ZNF281, que comprende las etapas de

(a) cultivar células mononucleares aisladas de la sangre de cordón umbilical en un recipiente de cultivo cubierto con fibronectina y que contiene un medio EGM-2™ o SNU-1 como se define en la Tabla 1 con suero bovino fetal (FBS), bFGF, ácido ascórbico, EGF, hidrocortisona, IGF-I, VEGF y heparina; y
(b) recolectar las células madre cultivadas del cultivo, en donde la célula madre se encuentra en un estado no diferenciado.

El paso de recolectar las células madre del cultivo comprende utilizar una propiedad inmunológica de las células madre para separar las células madre.

El aislamiento de células mononucleares de la sangre de cordón umbilical se puede lograr usando un procedimiento típico. Después de mezclar la sangre de cordón umbilical con Hetasep™ para agotar los eritrocitos, se aíslan los monocitos utilizando Ficoll®-paque. Aquí, Hetasep™ se usa preferiblemente en una cantidad de 0,5~2 mL por 5 mL de Hetasep™.

Hetasep™ es un agente de agregación de eritrocitos que se utiliza para separar rápidamente las células nucleadas de los glóbulos rojos (RBC) en la sangre completa. Ficoll®-paque es un medio estéril listo para usar para el aislamiento de linfocitos con alto rendimiento. Normalmente se coloca en la parte inferior de un tubo cónico, y la sangre se coloca lentamente sobre Ficoll®-paque.

Para aumentar el rendimiento de aislamiento de las células mononucleares de las mismas, la sangre de cordón umbilical utilizada en la presente invención es preferiblemente una que se recupera inmediatamente después del parto, una que se almacena a temperatura ambiente durante 12~48 horas después de la recuperación, o una que se almacena a 3~5°C durante 6~72 horas después de la recuperación.

El aislamiento de células madre de las células mononucleares derivadas de la sangre de cordón umbilical se caracteriza por el uso de fibronectina. El término "recipiente de cultivo que contiene fibronectina", como se usa en el presente documento, pretende significar una condición en la que las células mononucleares pueden ponerse en contacto con la fibronectina. Por ejemplo, la fibronectina puede estar dispuesta en capas sobre un recipiente de cultivo o puede estar contenida en forma de esferas o estructuras tridimensionales en un medio de cultivo. En una realización de la presente invención, cuando el recipiente de cultivo está recubierto con el mismo, la fibronectina puede estar contenida a una densidad de 0,1 a 1 mg/mL.

La fibronectina útil en la presente invención puede derivar de animales sin limitación y preferiblemente de seres humanos. Además, la fibronectina puede prepararse mediante síntesis artificial (por ejemplo, síntesis química, síntesis utilizando un sintetizador de péptidos, etc.) o biosíntesis (por ejemplo, tecnología de ADN recombinante, cultivo de fibroblastos, etc.) o puede separarse del plasma de animales, incluidos los humanos, a partir de las matrices extracelulares. La fibronectina puede ser un fragmento o secuencia peptídica de la fibronectina o puede contener el fragmento o péptido.

No se imparten limitaciones particulares al medio disponible cuando las células mononucleares se cultivan en el recipiente de cultivo recubierto con fibronectina. SNU-1 o EGM-2 se utiliza como medio fundamental para el cultivo de los monocitos.

El medio SNU-1 contiene la siguiente composición (Tabla 1).

TABLA 1

	SNU-1 (mg/l)		SNU-1 (mg/l)		SNU-1 (mg/l)
$CaCl_2$(anhidro.)	200	L-isoleucina	78	i-Inositol	3
KCL	400	L-Leucina	78	Riboflavina	0,15
$MgSO_4$(anhidro.)	97.67	L-Lisina HCl	108,75	Tiamina HCl	1,5
NaCl	7635	L-Metionina	22,5	L-Alanina	17,8
NaH_2PO_4 H_2O	140	L-Fenilalanina	48	L-Asparagina H_2O	30
D-Glucosa	1000	L-Serina	21	Ácido L-Aspártico	26,6
Fenol Rojo	10	L-Treonina	72	Ácido L-Glutámico	29,4
Piruvato de Sodio	110	L-Triptófano	15	L-Prolina	23
L-Arginina HCl	189	L-Tirosina 2Na $2H_2O$	54	Nicotinamida	1,5
L-Cisteína 2HCl	36	L-Valina	69	Piridoxina Hcl	1,5
L-Glutamina	292	D-Ca pantotenato	1,5	$NaHCO_3$	1000
Glicina	15	Cloruro de Colina	1,5		
L-Histidina HCl H_2O	63	Ácido Fólico	1,5		

En la presente invención, el medio fundamental se complementa con FGF-B (Factor de Crecimiento de Fibroblastos), ácido ascórbico, EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), hidrocortisona, IGF-1 (Factor de Crecimiento de Tipo Insulínico 1) o VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial), y heparina y opcionalmente con GA-1000 (Sulfato de Gentamicina, Anfotericina B) si es necesario.

Más preferiblemente, el medio fundamental se complementa con suero fetal bovino (FBS) 20%, bFGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos) 1~40 ng/ml, ácido ascórbico 0,1~5,0 µg/ml, EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) 1~40 ng/ml, hidrocortisona 0,1~1 µg/ml, IGF-I (Factor de Crecimiento Similar a la Insulina-1) 1~40 ng/ml o VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) 1~5 ng/ml y heparina 20~25 µg/ml y opcionalmente con GA-1000 (Sulfato de Gentamicina, Anfotericina-B) si es necesario.

Después de ser cultivadas durante tres días, las células mononucleares que permanecen suspendidas se eliminan mientras que solo se cultivan las células adherentes. Entre las células mononucleares adheridas al recipiente, solo proliferan las células madre. De 12 a 20 días después del aislamiento, se puede observar una rápida proliferación de las células madre. En este contexto, el medio se reemplaza preferiblemente por uno nuevo cada dos o tres días.

Para obtener células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical del cultivo, se puede usar FACS utilizando un citómetro de flujo con una función de clasificación (Int. Immunol., 10(3):275, 1998), perlas magnéticas o un procedimiento de barrido basado en se puede usar un anticuerpo específico para células madre mesenquimales (J. Immunol., 141(8):2797, 1998). Para obtener células madre pluripotentes/multipotentes a partir de un volumen de masa de cultivo, se puede usar una columna en la cual se inmovilizan anticuerpos específicos para moléculas expresadas en superficies celulares (en adelante, "antígeno de superficie") solo o en combinación.

La clasificación por citometría de flujo puede realizarse mediante carga electrostática de gotitas o captura de células. En cualquiera de los procesos, un anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno de superficie se marca con fluorescencia, después de lo cual se mide la intensidad fluorescente del conjugado anticuerpo-antígeno marcado y se convierte en señales eléctricas para determinar el nivel de expresión del antígeno de las células. Además, se pueden usar diferentes tipos de fluoróforos en combinación para separar células que expresan diferentes antígenos de superficie. Entre los fluoróforos se encuentran FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (aloficocianina), TR (TexasRed), Cy3, CyChrome, Red613, Red670, TRI-Color y QuantumRed.

En FACS que utiliza un citómetro de flujo, las células madre extraídas del cultivo, por ejemplo, mediante centrifugación pueden inmunocontenerse directamente con un anticuerpo o pueden proliferar en un medio adecuado antes de la inmunotinción con un anticuerpo. Para la inmunotinción, una muestra de células diana se mezcla con un anticuerpo primario específico para un antígeno de superficie y se incuba durante 0,5 a 1 hora en hielo. Si el anticuerpo primario está marcado con un fluoróforo, la muestra de células se lava y se separa con un citómetro de flujo. Si el anticuerpo primario no está marcado con un fluoróforo, la muestra de células tratada con el anticuerpo primario se lava y se mezcla con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia que puede unirse al anticuerpo primario. Luego, las células inmunoteñidas se incuban de nuevo durante 0,5 a 1 hora en hielo y se lavan antes de separarlas con un citómetro de flujo.

Las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical aisladas de acuerdo con la presente invención tienen al menos una de las siguientes propiedades:

(a) muestra una característica inmunológica positiva a los factores de transcripción c-myc y ZNF281.
(b) se adhiere a una superficie recubierta con matriz extracelular y forma colonias celulares en forma de huso o esférica de 5 a 30 días después de la adhesión.
(c) muestra un CPDL (nivel de duplicación de la población acumulada) de 30 a 45.
(d) muestra una característica inmunológica negativa para CD14, CD31, CD34, CD45 y HLA-DR.
(e) capacidad para diferenciarse en células mesodérmicas, endodérmicas y ectodérmicas.
(f) secreta al menos una citoquina o quimioquina seleccionada del grupo que consiste en TIMP-2, TGF-β, RANTES CINC-3, EOTAXIN, GM-CSF, IFN-γ, IL-1b, IL-3, IL -6, IL-8, IL-10, IL12p40, IL13, IL-16, IP-10, Leptina, MCP-2, MIG, MIP-3a, b-NGFm, sTNFRI y PFGF-bb.

El hecho de que las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención permanezcan indiferenciadas es evidente a partir de la expresión de Oct-4, Sox-2, Rex-1, c-myc y ZNF281 en las células madre.

Además, mostrando una CPDL (nivel de duplicación de la población acumulada) de 30 a 45, las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical son altamente proliferativas. Un análisis de cariotipo demostró que las células de la presente invención proliferan rápidamente, pero tienen una estructura cromosómica normal.

Las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención son inmunológicamente negativas para CD14, CD31, CD34, CD45 y HLA-DR, todas conocidas como marcadores de células madre hematopoyéticas o marcadores relacionados con la inmunoinyección. Debido a la falta de tales marcadores hematopoyéticos o relacionados con el inmunorrechazo, las células madre derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención se pueden trasplantar con una vascularización e inmunorrechazo mínimas y, por lo tanto, se pueden usar eficazmente en el trasplante alogénico.

Las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención también pueden diferenciarse en hepatocitos del mesodermo y neuronas y células relacionadas con la retina del ectodermo así como osteoblastos, condrocitos y células adiposas del mesodermo. Por lo tanto, las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención se pueden usar para tratar una variedad de enfermedades.

Además, las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención pueden segregar varias citoquinas o quimioquinas que incluyen TIMP-2, TGF-β, RANTES CINC-3,

EOTAXIN, GM-CSF, IFN-γ, IL-1b , IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p40, IL13, IL-16, IP-10, Leptina, MCP-2, MIG, MIP-3a, b-NGFm, sTNFRI y PFGF-bb. Al tener la capacidad de segregar estas citoquinas o quimioquinas, las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención se pueden aplicar al tratamiento de diversas enfermedades.

La naturaleza novedosa de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención proviene de que tienen estas características.

Como se describió anteriormente, las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención se pueden diferenciar en varios tipos de células, incluidos osteoblastos, condrocitos, células adiposas, hepatocitos y neuronas, y así encontrar aplicaciones en terapias para diversas enfermedades correspondientes. Por lo tanto, la presente invención proporciona un agente terapéutico celular que comprende las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical o las células diferenciadas de las mismas. El agente terapéutico celular de la presente invención se puede aplicar al tratamiento de diversas enfermedades que incluyen, por ejemplo, enfermedades neurales (por ejemplo, enfermedades neurales degenerativas), osteoartritis (por ejemplo, artritis degenerativa, artritis reumatoide), pérdida ósea (por ejemplo, osteoporosis), enfermedades hepáticas (por ejemplo, hepatocirrosis) y enfermedades cardiovasculares.

Preferiblemente, el agente terapéutico celular como se describe contiene al menos un diluyente que puede proteger y mantener las células. Se pueden usar soluciones diluidas tales como solución salina fisiológica, PBS (solución salina regulada con fosfato), HBSS (solución salina equilibrada de Hank) y componentes de plasma o suero como diluyentes.

De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención se refiere al uso de un medio para cultivar las nuevas células madre. El medio se basa en el medio EGM-2 o SNU-1 y se complementa con suero bovino fetal (FBS) al 20%, bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos) 1~40ng/ml, ácido ascórbico 0,1~5,0 μg/ml, EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) 1~40ng/ml, hidrocortisona 0,1~1 μg/ml, IGF-I (Factor de Crecimiento Similar a la Insulina-1) 1~40ng/ml o VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) 1~5ng/ml y heparina 20~25 μg/ml, y opcionalmente con GA-1000 (Sulfato de Gentamicina, Anfotericina-B) si es necesario.

El medio de cultivo para células madre es nuevo y se utiliza en el procedimiento para aislar células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de acuerdo con la presente invención. Además, el medio de cultivo de la presente invención es útil para la proliferación de todas las células madre adultas, incluidas las células madre derivadas de la sangre de cordón umbilical y es aplicable al cultivo de células madre adultas.

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención aborda un procedimiento para cultivar células madre que comprende cultivar y proliferar células madre en el medio de la presente invención. Preferiblemente, las células madre pueden ser células madre adultas.

En una realización, el medio para cultivar células madre de acuerdo con la presente invención se puede usar para cultivar las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención. Mientras se cultivan en el medio de la presente invención, las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical pueden pasarse preferiblemente de 3 a 5 días después de la formación de colonias celulares en forma de huso. El cultivo se realiza preferiblemente en una condición de 5% de CO_2 y se puede llevar a cabo durante 5~30 días, pero la presente invención no se limita a esto.

Además, se describe un procedimiento para aumentar las células troncales de las células madre, caracterizado por un cultivo de esfera o un cultivo tridimensional de células madre mediante el cual se cultivan las células madre. Para el cultivo tridimensional, se usa preferiblemente MEF (Célula de fibroblasto embrionario de ratón). Además, las células madre pueden ser preferiblemente células madre adultas.

Como se usa en el presente documento, el término "aumento de la capacidad de células madre" significa formar una colonia similar a una célula madre embrionaria o expresar factores de transcripción como Oct4, Sox2, etc. a un nivel superior.

Efectos Ventajosos

Cuando se cultivan en presencia de fibronectina, como se explica en detalle más arriba, las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical humano de la presente invención proliferan activamente durante un período de tiempo más largo sin diferenciar, en comparación con las células madre adultas convencionales. Además, al tener la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células como condrocitos, osteoblastos y células adiposas, las células madre pluripotentes/multipotentes de la presente invención se pueden aplicar de manera efectiva al tratamiento de enfermedades convencionales incurables, así como enfermedades neuronales, enfermedades cardiovasculares, y enfermedades del sistema esquelético.

Descripción de los Dibujos

La FIGURA 1 es de fotografías que muestran colonias formadas después de cultivar las células mononucleares aisladas de la sangre de cordón umbilical humano durante 14, 15, 16, 17 y 18 días (A, B, C, D y E, respectivamente) y células después del paso 3 (F);

La FIGURA 2 es un gráfico en el que el crecimiento celular acumulado se representa frente al tiempo.

La FIGURA 3 muestra los resultados del análisis de cariotipo después de que las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical se cultivan durante un largo período de tiempo.

La FIGURA 4 es una muestra de citogramas de flujo que muestran los patrones de expresión de diversos marcadores en las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención.

La FIGURA 5 muestra los patrones de expresión de diversos marcadores de no diferenciación en las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención medidos por citometría de flujo e inmunotinción (A: citograma de flujo de las células que expresan Oct4, B: imagen de inmunocontenida Oct4 C: imagen del núcleo teñido en células expresadas en Oct4, D: imagen superpuesta de la expresión de Oct4 y tinción del núcleo).

La FIGURA 6 muestra la expresión de ZNF281 en terra-1, hUCB-MSC, AD-MSC y AM (panel superior) y en hUCB-MSC después de 3~9 pases (panel inferior) según lo analizado por FACS.

La FIGURA 7 muestra la expresión de ZNF281, Oct4, Sox2, c-myc y Rex-1, todos esenciales para el mantenimiento de la no diferenciación, en las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical humano de la presente invención, medida por RT PCR.

La FIGURA 8 es de fotografías que muestran la diferenciación de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical humano en osteoblastos, adipocitos, condrocitos y neuronas (A: control inducido por diferenciación no osteogénica después de la tinción con Rojo de Alizarina S, B: inducción por diferenciación osteogénica células después de teñir con Rojo de Alizarina S, C: control inducido por diferenciación no adipogénica después de teñir con Rojo Aceite O, D: células inducidas por diferenciación adipogénica después de teñir con Rojo Aceite O, E: células inducidas por diferenciación condrogénicas después de teñir con azul de toluidina , F: sedimento de células inducidas por la diferenciación condrogénica, células G: inmunoteñidas con marcadores neurales Tuj-1 y MAP2 después de la diferenciación neural).

La FIGURA 9 muestra los niveles de ARN de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical después de la inducción de la diferenciación osteogénica y la diferenciación adipogénica, medidos por RT-PCR (PPAR-γ y FABP-4 son marcadores de diferenciación adipogénicos y el Tipo de Colágeno 1 es marcador de diferenciación osteogénico. PPAR-γ: receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma, FABP-4: proteína 4 de unión a ácidos grasos, GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

La FIGURA 10 muestra los patrones de expresión de proteínas relacionadas con la retina en las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención.

La FIGURA 11 muestra la secreción de diversas citoquinas a medios de cultivo de células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical humano, según se analiza mediante una matriz de anticuerpos (A: hUCB-MSC1, B: hUCB-MSC2, C: hUCB-MSC3, D: una disposición de anticuerpos, POS: Control positivo, NEG: Control negativo, GCSF: Factor estimulante de Granulocitos y Colonias, GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos, ICAM-1: Molécula de Adhesión Intra-Celular, IFN-γ: Interferón-γ, IL: Interleucina, MCP: Proteína Quimioatrayente de Monocitos, M-CSF: Factor Estimulante de las Monolitos-Golonias, MIG: Monoquina inducida por interferón Gamma, MIP: Proteína Inflamatoria de Macrófagos, RANTES: Regulada sobre Activación, Células T Normales Expresadas y Secretadas, TGF-β: Factor de Crecimiento Transformante-β, TNF: Factor de Necrosis Tumoral, sTNFR: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral soluble, PDGF-BB: Factor de Crecimiento Derivado de las plaquetas-BB, TIMP2: Inhibidor Tisular de las Metaloproteinasas-2).

Las FIGURAS 12 y 13 son fotografías que muestran cultivos tridimensionales de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical utilizando un proceso de cultivo de esfera y células STO y los patrones de expresión de los factores de transcripción Oct4 y Sox2 medidos mediante RT-PCR (FIGURA 12: un cultivo tridimensional de células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical mediante un proceso de cultivo en esfera, FIGURA 13: un cultivo tridimensional de células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical en células STO).

Modo de la Invención

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se presentan para ilustrar, pero que no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

EJEMPLO 1: Cultivo, proliferación y análisis de cariotipo de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical

Las muestras de término completo de UCB (n=20) se recolectaron inmediatamente después del parto con el consentimiento informado de las madres. El término completo UCB se mezcló con HetaSep (Stem cells Technologies INC, Vancouver, BC) para agotar los recuentos de eritrocitos. Luego, se obtuvieron células mononucleares mediante una centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll típica. Los monocitos se sembraron a una densidad de 1 x $10^{5\sim8}$ células/pocillo en placas de 6 pocillos recubiertos con 0,1 mg/ml - 1 mg/ml de fibronectina y se mantuvieron en SNU-1 o EGM-2 (Lonza) suplementado con EGM- 2 SingleQuots que contienen 20% de FBS. Los EGM-2 SingQouts contenían heparina, ácido ascórbico, rhEGF, hidrocortisona, VEGF, rhFGF-B, R3-IGF-1 y GA-1000. Los monocitos que aún permanecían no adheridos tres días después del cultivo se eliminaron mientras que el medio se reemplazó por uno nuevo cada dos o tres días.

Se observó que las células adherentes formaban colonias, exhibiendo una morfología en forma de huso 5-30 días después de ser cultivadas bajo condiciones de CO_2 al 5% (FIGURA 1A). Una vez formadas, las colonias proliferaron rápidamente. Las células se suspendieron con 0,125% de tripsina-EDTA 3~7 días después de la formación de colonias y se transfirieron a placas frescas donde las células continuaron manteniéndose (FIGURAS 1B, 1C, 1D, 1E y 1F). La FIGURA 1 es de fotografías que muestran el progreso del cultivo de las células. Como se aprecia en la FIGURA 1, la colonia celular se hizo más grande con el transcurso del tiempo. Además, incluso después del pasaje, la morfología de las células se mantuvo uniforme (FIGURA 1. Aislamiento y proliferación de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical. Las colonias se formaron después de que las células mononucleares se cultivaron durante 14 días (A), 15 días (B), 16 días (C), 17 días (D) y 18 días (E) y células después del paso 3 (F)).

Mientras se continuaron cultivando, se analizó la capacidad de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical aisladas midiendo el CPDL (nivel acumulativo de duplicación de la población) (Cristofalo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 95, 1998). Las células se dividen por fisión binaria. Por lo tanto, la tasa de crecimiento de las células se puede determinar por el tiempo que tarda una célula en dividirse en dos, lo que se denomina tiempo de duplicación. Un CDPL de 10 significa 10 fisiones de una célula, lo que resulta en la proliferación de una célula a aproximadamente 1000 células. Uno de los mayores problemas de las células madre convencionales derivadas de la sangre de cordón umbilical es que tienen una capacidad de proliferación significativamente baja, en comparación con las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo o de la médula ósea. Debido a que las aplicaciones clínicas requieren un gran número de células madre, la capacidad de proliferación de las células madre es importante. La medición se realizó de la siguiente manera. Primero, se aislaron células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de tres tipos de muestras diferentes de sangre de cordón umbilical y se sembraron a una densidad de $2x10^5$ células en 100 placas y se pasaron a intervalos regulares de tres a cuatro días mientras se contaron usando un citómetro. Se realizó el recuento de células hasta que las células dejaron de crecer. Los valores de CPDL se obtienen sobre la base de las mediciones de los recuentos de células de acuerdo con la siguiente Fórmula Matemática 1.

[Fórmula Matemática 1]

$$N_H/N_I = 2^x \text{ o } [\log(N_H) - \log(N_I)]\log(2) = X$$

en donde, N_I significa el número de células en el cultivo inicial y N_H significa el número de células en una condición de saturación en el pasaje.

Los valores de CPDL se calcularon mientras las células seguían manteniéndose. Para comparación, se utilizó hUCB-EPC (células progenitoras endoteliales derivadas de la sangre de cordón umbilical humano) como control. Los resultados se muestran en la FIGURA 2. Como puede verse en la gráfica de la FIGURA 2, hUCB-EPC tuvo un CPDL de aproximadamente 20 a lo largo de dos meses, mientras que el CPDL de todas las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical de tres muestras diferentes osciló entre 40 y 45. Estos valores numéricos indican que las células pueden crecer teóricamente hasta el número de 10^{12} en una colonia.

En general, las células con una capacidad de gran proliferación pueden convertirse en cancerosas, exhibiendo un crecimiento explosivo. Una vez que son cancerizadas, es probable que las células proliferen independientemente de diversas señales reguladoras en el cuerpo, por lo que no pueden usarse como un agente terapéutico celular y son inconsistentes con el propósito del estudio. Por lo tanto, debe determinarse si los cromosomas de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical aisladas de acuerdo con la presente invención son normales. En este contexto, se realizó un análisis de cariotipo para examinar los cromosomas de las

células. Como puede verse en la FIGURA 3, se encontró que las células tenían una estructura cromosómica normal incluso después del pase 10.

EJEMPLO 2: Análisis del antígeno de superficie de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical

La citometría de flujo se llevó a cabo para analizar las características de las células suspendidas en los medios. Para la fenotipificación de antígenos de la superficie celular, las células recogidas después de 3~4 pasajes se tiñeron con un anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con ficoeritrina (PE) y se analizaron con FACSAria (Becton Dickinson, NY).

Los antígenos de superficie utilizados para analizar las características de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical (células madre parcialmente pluripotentes/multipotentes) aisladas en la presente invención incluyen CD10 (marcador de células T), CD14 (marcador de monocitos), CD24 (epitelial) marcador de células), CD29 (marcador de monocitos), CD31 (marcador de células endoteliales), CD34 (marcador de células madre hematopoyéticas), CD44 (marcador de células madre mesenquimales), CD45 (marcador de células madre no hematopoyéticas), CD51/61 (marcador de osteoclastos) , CD73 (marcador de células madre mesenquimales), CD90 (marcador de células madre mesenquimales), CD105 (marcador de células madre mesenquimales), CD133 (marcador de células madre hematopoyéticas) y HLA-DR (marcador relacionado con el inmunorrechazo), y se analizaron utilizando un citómetro de flujo. Los resultados se resumen en la Tabla 2 y se representan gráficamente en la FIGURA 4.

TABLA 2

Antígeno CD en Células Madre Pluripotentes/multipotentes derivadas de la Sangre de Cordón Umbilical	Células teñidas positivamente / células totales (%)
CD10	0,2 ± 0,1
CD14	2,0 ± 1,0
CD24	68,7 ± 2,9
CD29	100 ± 0,0
CD31	0,4 ± 0,7
CD34	3,5 ± 3,4
CD44	100 ± 0,1
CD45	0,0 ± 0,1
CD51/61	6,4 ± 10,8
CD73	99,6 ± 0,5
CD90	99,7 ± 0,3
CD105	99,5 ± 0,8
CD133	0,1 ± 0,1
HLA-DR	2,0 ± 3,2

EJEMPLO 3: Patrón de expresión de ZN281 y factor de transcripción central en las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical

La ZNF281 (proteína de dedo de zinc 281) es uno de los factores de transcripción centrales de ESC (Wang J et al. (2006) Nature 444, 364-368). La ZNF281, también llamada ZBP-99, contiene cuatro dedos de zinc tipo Kruppel que comparten en conjunto 91% de similitud de secuencia de aminoácidos y 79% de identidad de secuencia con los encontrados en ZBP-89. Además, hay secuencias de aminoácidos altamente conservadas en los segmentos carboxi-terminales de los dos genes. El marco de lectura abierto previsto del ADNc de ZNF281 codifica una proteína de 99 kDa. El EMSA (cambio de movilidad electroforética como dice) mostró que la proteína ZNF281 se une específicamente a los elementos promotores ricos en GC de los genes GASTRINA y ORNITINA DESCARBOXiLASA (Law DJ et al. (1999) Biochem Biophys Res Commun 262, 113-120; Lisowsky T et al. 1. (1999) FEBS Lett 453, 369-374). La ZNF281 se identificó como una proteína asociada a c-MYC mediante la tecnología de identificación de proteínas multidimensional espectral de masas y la purificación por afinidad en tándem (Koch HB et al. (2007) Cell Cycle 6, 205-217).

Se sabe que los genes Oct3/4, tales como los factores de transcripción de la familia POU, no existen en tejidos diferenciados, pero se expresan particularmente en células madre indiferenciadas que tienen una alta capacidad proliferativa (Tai M-H. et al., Carcinogenesis 26:4 95, 2005; Tondreau T. et al., Stem cells, 23:1105, 2005). En general, Oct3/4 se utilizan, por lo tanto, como marcadores para células madre embrionarias y también como marcadores indicativos de no diferenciación. Las colonias celulares se tiñeron utilizando Oct4 como marcador de la capacidad de células madre. Como resultado, se encontró que muchas células se habían teñido con Oct4 alrededor del núcleo. La citometría de flujo también demostró la expresión de Oct4 en las células.

Para teñir proteínas intracelulares, las células se fijaron a 4°C durante la noche con formaldehído al 4% y se permeabilizaron durante 10 minutos con Triton X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich). Los portaobjetos y las placas se incubaron durante una hora con un anticuerpo primario de ratón Oct4 antihumano (1: 200), se lavaron con PBS (solución salina regulada con fosfato; Gibco), se inmunotiñeron durante una hora con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra conjugado con Alexa594 (Invitrogen) mientras el núcleo fue contrateñido con DAPI.

Como se aprecia en las FIGURAS 5 y 6, se encontró que muchas de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical expresaban Oct4 (FIGURA 5A: citograma de flujo de las células que expresan Oct4, B: imagen de Oct4 C inmunocontenida: imagen del núcleo teñido en Oct4 células expresadas, D: imagen superpuesta de la expresión de Oct4 y tinción del núcleo).

Los genes tales como Oct4 están estrechamente asociados con la raíz de las células madre. De hecho, recientemente se han hecho intentos para inducir que las células madre adultas tengan una pluripotencia similar a la de las células madre embrionarias al hacer que expresen en exceso genes como Oct4, Sox2 y similares (Takahashi et al, Cell, 131(5), 861-872, 2007). En consecuencia, la expresión de estos genes en las células madre es muy importante para mantener a las células madre en un estado indiferenciado sin perder la capacidad de células madre. Por lo tanto, para examinar los patrones de expresión de ZNF281, Oct-4 y Sox2 en las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical aisladas de acuerdo con la presente invención, se realizó la RT-PCR.

Para esto, se construyeron cebadores como en la Tabla 3.

TABLA 3

Gen diana	Dirección	Secuencia	SEQ ID NO:
OCT-4	cebador en sentido	5'-CGAAAGAGAAAGCGAACCAG-3'	1
	cebador antisentido	5'-GCCGGTTACAGAACCACACT-3'	2
SOX2	cebador en sentido	5'-CCTCCGGGACATGATCAG-3'	3
	cebador antisentido	5'-TTCTCCCCCCTCCAGTTC-3'	4
C-MYC	cebador en sentido	5'-TACCCTCTCAACGACAGCAG-3'	5
	cebador antisentido	5'-GGGCTGTGAGGAGGTTTG-3'	6
ZNF281	cebador en sentido	5'-ACGTAACAGCGCAGACAGAA-3'	7
	cebador antisentido	5'-GTGTTGAAGCCCAAGTGGTT-3'	8
REX-1	cebador en sentido	5'-TGAAAGCCCACATCCTAACG-3'	9
	cebador antisentido	5'-CAAGCTATCCTCCTGCTTTGG-3'	10

Como se aprecia en la FIGURA 7, Oct-4, Sox2, c-myc, ZNF281 y REX-1 se expresaron, lo que indica que las células madre derivadas de la sangre de cordón umbilical de la presente invención tienen pluripotencia.

EJEMPLO 4: Diferenciación de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical en osteoblastos

Las células fueron inducidas a diferenciarse en osteoblastos. A este respecto, se permitió que las células se adhirieran a las placas de cultivo y se incubaron hasta aproximadamente 70-80% de confluencia. Luego, el medio de cultivo se reemplazó con un medio inductor de diferenciación osteogénico. El medio inductor de diferenciación osteogénico se preparó complementando DMEM baja en glucosa con FBS al 10% más 10 mM de beta-glicerofosfato (Sigma-Aldrich), dexametasona D 0,1 µM (Sigma-Aldrich) y ascorbato 50 µM (Sigma-Aldrich). El medio se reemplazó por uno nuevo cada tres días, mientras que la diferenciación se indujo durante aproximadamente dos semanas.

Después de dos semanas, la mineralización por calcio atribuida a la diferenciación osteogénica se examinó mediante tinción con Rojo de Alizarina S. La tinción se realizó de la siguiente manera. Después de retirar el medio, las células se lavaron dos veces con agua destilada y se fijaron a 4°C durante una hora en EtOH al 70% frío. Luego, las células se lavaron de nuevo dos veces con agua destilada y se tiñeron a temperatura ambiente durante 10 minutos con Rojo de Alizarina S 40 mM, seguido de lavado cinco veces con agua destilada.

Como se aprecia en las FIGURAS 8A y 8B, en la FIGURA 8A el Rojo de Alizarina S no detectó calcio en ausencia de diferenciación, mientras que en la FIGURA 8B el calcio apareció de color rojo cuando se indujo a las células a diferenciarse en osteoblastos, lo que indica que las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical se diferenciaron en osteoblastos que liberan calcio.

EJEMPLO 5: Diferenciación de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical en células adiposas

Las células fueron inducidas a diferenciarse en células adiposas. A este respecto, se permitió que las células se adhirieran a las placas de cultivo y se cultivaron hasta aproximadamente un 70-80% de confluencia. Entonces, el medio se reemplazó con un medio de diferenciación de adipocitos. El medio de diferenciación de adipocitos se preparó complementando DMEM con bajo contenido de glucosa con 10% de FBS más 1 µM de Dexametasona, 10 µg/ml de insulina (Sigma-Aldrich), 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma-Aldrich) y 0,2 mM de indometacina (Sigma-Aldrich). El medio de diferenciación se reemplazó con uno nuevo cada tres días, mientras que la diferenciación se indujo durante aproximadamente 2-3 semanas.

Después de 2~3 semanas, se examinó la diferenciación de los adipocitos mediante tinción con Rojo Aceite O. Para esto, el medio se eliminó y las células se lavaron en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos en formalina al 10%. La formalina se reemplazó con el mismo volumen de uno nuevo, seguido de la fijación de las células a temperatura ambiente durante al menos una hora. Después de la eliminación de la formalina, las células se lavaron con isopropanol al 60%. El alcohol se evaporó completamente antes de teñir las células a temperatura ambiente durante 10 minutos con Rojo Aceite O. Inmediatamente después de eliminar este colorante, las células se lavaron en agua destilada.

Los adipocitos aparecen rojos después del tratamiento con Rojo Aceite O porque tiñe las gotitas de lípidos de color rojo. Como puede verse en las FIGURAS 8C y 8D, en la FIGURA 8C no se detectaron gotas de lípidos ni el aspecto rojo en ausencia de diferenciación de adipocitos, mientras que en la FIGURA 8D cuando se indujo a diferenciarse en adipocitos, se observó que las células tenían muchas gotitas de lípidos y, por lo tanto, se volvían rojas).

EJEMPLO 6: Diferenciación de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical en condrocitos

Para inducir a las células a condrocitos de diferenciación, las células se trataron durante tres semanas con el medio de diferenciación condrogénico que contiene rTGF-beta 3 (PT-3003) de Lonza, mientras que el medio se reemplazó dos veces a la semana por uno nuevo. La condrogénesis se midió una vez a la semana.

Para examinar la diferenciación condrogénica, se realizó una tinción con azul de toluidina. Las células se fijaron durante 10 horas con formaldehído al 4% y luego durante 10 horas adicionales con ácido pícrico. Después de la criosección, las células se tiñeron durante 3 minutos con azul de toluidina y se sometieron a una tinción de contraste durante 3 segundos con hematoxilina.

Una pella de condrocitos no se colapsa, pero mantiene una morfología constante y aparece azul cuando se tiñe con azul de toluidina. Como puede verse en las FIGURAS 8E y 8F, se observó que las células sometidas a diferenciación condrogénica se tiñen de azul y mantienen su morfología.

EJEMPLO 7: Cambio en el nivel de expresión génica después de la diferenciación de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical en osteoblastos y adipocitos

Se observó que las células madre cambiaban significativamente en los patrones de expresión génica mientras experimentaban el proceso de diferenciación. Como regla general, el nivel de expresión de PPAR-γ (Receptor-γ activado por el proliferador de peroxisoma) o FABP4 (proteína 4 de unión a ácidos grasos) aumenta con la diferenciación de las células madre en adipocitos, mientras que el nivel de expresión del colágeno tipo 1 aumenta

con la diferenciación de células madre en osteoblastos (Mat hews et al., J Am Acad Dermatol, 56(3), 472-492, 2007; Cho et al., J. Cell. Biochem., 96, 533-542, 2005). Por consiguiente, después de inducir la diferenciación, el nivel de expresión de un gen que se expresa en células de un tipo específico indica indirectamente si las células madre se han diferenciado en células del tipo específico. Los experimentos se realizaron de la siguiente manera.

Dos o tres semanas después de la diferenciación en osteoblastos y adipocitos, se aisló el ARN total de las células usando Trizol (Invitrogen). El ADNc se sintetizó utilizando la premezcla de AccuPower RT (Bioneer), seguido de la PCR con el kit Maxime PCRPreMix (Intronbio).

Para esto, se diseñaron cebadores como se muestra en la Tabla 4, a continuación.

TABLA 4

Gen diana	Dirección	Secuencia	SEC ID NO:
PPAR-γ	Cebador en sentido	5'-TGCTTTTGTAGGTACCTGGA-3'	11
	Cebador antisentido	5'-CATAAACTCTCGTGGAAGTG-3'	12
FABP4	cebador en sentido	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	13
	Cebador antisentido	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'	14
Colágeno Tipo 1	Cebador en sentido	5'-GAGAGAGAGGCTTCCCTGGT-3'	15
	Cebador antisentido	5'-CACCACGATCACCACTCTTG-3'	16

Como se desprende de los datos de la FIGURA 9, los niveles de expresión de PPAR-γ y FABP4, que son marcadores para la diferenciación de adipocitos, aumentaron considerablemente cuando las células fueron inducidas a diferenciarse en adipocitos. Además, el nivel de expresión del colágeno tipo 1, un actor de la diferenciación osteogénica, se incrementó en gran medida en las células que pasan por la diferenciación. Mientras tanto, se detectó el mismo nivel de control de carga GAPDH en ambas células que habían y no habían pasado por diferenciación, lo que respalda la razonabilidad del experimento.

EJEMPLO 8: Diferenciación de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical en neuronas

Las células fueron inducidas a diferenciarse en neuronas. Primero, las células se preincubaron durante 24 horas en DMEM complementado con FBS al 5% y 10ng/ml de bFGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico). Posteriormente, las células se trataron durante 24 horas en DMEM que contenía DMSO al 1%, BHA 100 µM, VPA 0,5mM, KCl 10 mM y NGF 10 ng/ml, y B27 para inducir la diferenciación neuronal. Para examinar la diferenciación neuronal, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se inmunotiñeron para los marcadores neuronales Tuj-1, MAP-2, GFAP y Neurofilament-160. Como resultado, se observó que los cuatro marcadores estaban expresados (FIGURA 8G).

EJEMPLO 9: Expresión de proteínas específicas de la retina en células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical

Las características relacionadas con la retina de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical se examinaron mediante inmunofluorescencia.

Se examinaron los patrones de expresión de proteínas específicas de la retina en las células.

La FIGURA 10 es de fotografías que muestran patrones de expresión de proteínas específicas de la retina medidos por inmunofluorescencia. Los patrones de expresión de PAX6 y proteína Hu se muestran en la FIGURA 10 A. El PAX6 se conoce como un marcador progenitor de la retina y la proteína Hu se expresa específicamente en células gaglionares y células amacrinas, que son componentes de la retina. No fueron detectados en un cultivo normal.

En la FIGURA 10B, se detectan opsina y rodopsina. La opsina se expresa específicamente en células de cono, mientras que la rodposina es específica para células de varilla. En un cultivo normal, no se detectó opsina, pero se observó la expresión de rodopsina.

Se muestra en la FIGURA 10C los patrones de expresión de CRX y Recoverina. El CRX se conoce como marcador de panfotorreceptor y Recoverina como marcador de fotorreceptor. Estos marcadores no se detectaron en un cultivo normal (aumento x 400, barra de escala = 50 µm).

Ejemplo 10: Análisis de citoquinas liberadas a partir de células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical

La capacidad terapéutica de las células madre se puede atribuir en gran parte a dos efectos: primero, la diferenciación directa de las células madre en células dañadas; y en segundo lugar, la capacidad de segregar diversas citoquinas o factores de crecimiento que inducen alteraciones positivas que conducen a un efecto terapéutico en células preexistentes. En general, se sabe que las células madre secretan diversas citoquinas o factores de crecimiento, que muestran los llamados efectos paracrinos (Kim et al. Cytokine. 2005). Para examinar los patrones de secreción de las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical aisladas de acuerdo con la presente invención, se usó una matriz de anticuerpos de citoquina (RaybioTech. Norc ross, USA).

Primero, las células se estabilizaron durante 24 horas en un medio libre de FBS y suplementos, después de lo cual el medio se tomó en una cantidad de 1 mL a intervalos regulares de 2 horas. Cada una de las muestras del medio se recogió en una cantidad de 100 µL para formar un conjunto que se analizó cuantitativamente para determinar el nivel de proteína, seguido de un ensayo en una matriz

Como se muestra en la FIGURA 11, se encontró que todas las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical aisladas de tres muestras diferentes secretaban IL-8 y TIMP-2. Además, la secreción de diversas citoquinas incluyendo TGF-β, RANTES, CINC-3, EOTAXIN, GM-CSF, IFN-γ, IL-1b, IL-3, IL-6, IL-10, IL12p40, IL13, IL -16, IP-10, leptina, MCP-2, MIG, MIP-3a, b-NGFm, sTNFRI y PFGF-bb también se observaron (la FIGURA 11 muestra los resultados del análisis de matriz de hUCB-MSC1 (A), hUCB- MSC2 (B) y hUCB-MSC3 (C) y una disposición de anticuerpos (D)).

EJEMPLO 11: Cultivo tridimensional de células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical

Generalmente, las células madre adultas crecen, formando una monocapa en una placa de cultivo. Sin embargo, los experimentos demostraron que la capacidad madre de las células madre adultas aumentó cuando las células madre adultas no crecieron en un estado bidimensional, sino como una esfera en un estado tridimensional. A este respecto, primero, las placas de cultivo se recubrieron con agarosa al 0,7% hasta un grosor de 5 mm o más para que las células no pudieran adherirse al fondo, sino que formaran esferas. Las células se sembraron a una densidad de menos de 2000 células/cm^2 para evitar la adhesión entre células individuales. Las esferas así formadas se separaron de las células individuales utilizando un filtro de 40 µm. Como puede verse en la FIGURA 12, las células madre no sufrieron la muerte celular, sino que formaron esferas, manteniendo las características de las células madre cuando se cultivaron en un sistema de cultivo de esfera. Como se aprecia en las FIGURAS 12A-D, se observó que los niveles de expresión de marcadores embrionarios como OCT4, SOX2 y similares en células que se mantuvieron en un cultivo de esfera eran mayores en comparación con aquellos que se mantuvieron como una monocapa.

Las células madre embrionarias se cultivan típicamente en una capa de células de fibroblastos embrionarios de ratón porque las quimioquinas, como LIF, de las células de fibroblastos embrionarios de ratón desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la morfología de las células ES y en la prevención de la diferenciación de las células ES. Cuando se cultivaron en una capa de células de fibroblastos embrionarios de ratón, las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical no crecieron en forma plana como las células madre adultas típicas, sino que formaron colonias tridimensionales. Después de suprimir su proliferación mediante tratamiento con mitomicina C 0,1 mg/ml, se sembraron células STO a una densidad de 2 x 10^5 células/ml en placas recubiertas con gelatina al 0,1% y se incubaron durante 24 horas, seguido de siembra de la sangre de cordón umbilical células madre pluripotentes/multipotentes derivadas en la capa de células STO. Como se aprecia en la FIGURA 13, se observó que las células proliferaban en las células STO en un patrón que era similar al de las células madre embrionarias con el transcurso del tiempo.

Aplicabilidad Industrial

Cuando se cultivan en presencia de fibronectina, las células madre pluripotentes/multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical humano de la presente invención proliferan activamente durante un período de tiempo más largo sin diferenciación, en comparación con las células madre adultas convencionales. Además, al tener la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células como condrocitos, osteoblastos y células adiposas, las células madre pluripotentes/multipotentes de la presente invención se pueden aplicar de manera efectiva al tratamiento de enfermedades convencionales incurables, así como enfermedades neuronales, enfermedades cardiovasculares, y enfermedades del sistema esquelético.

<110> SNU R&DB FOUNDATION

<120> Procedimiento para la expansión robusta y el aislamiento de células madre derivadas de la sangre de cordón umbilical que expresan ZNF281

<150> KR1020090023821

<151> 2009-03-20

<160> 16

<170> KopatentIn 1,71

<210> 1

<211> 20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

cgaaagagaa agcgaaccag 20

<210> 2

<211>20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

gccggttaca gaaccacact 20

<210> 3

<211> 18

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>3

cctccgggac atgatcag 18

<210>4

<211>18

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>4

ttctcccccc tccagttc 18

<210>5

<211>20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>5

taccctctca acgacagcag 20

<210>6

<211>18

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>6

gggctgtgag gaggtttg 18

<210>7

<211>20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>7

acgtaacagc gcagacagaa 20

<210>8

<211>20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>8

gtgttgaagc ccaagtggtt 20

<210>9

<211>20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>9

tgaaagccca catcctaacg 20

<210>10

<211>21

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400>10

caagctatcc tcctgctttg g 21

<210>11

<211>20

<212>ADN

<213>Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>11

tgcttttgta ggtacctgga 20

<210>12

<211>20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>12

cataaactct cgtggaagtg 20

<210>13

<211>20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>13

gagtcaacgg atttggtcgt 20

<210>14

<211>20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>14

gacaagcttc ccgttctcag 20

<210>15

<211>20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>15

gagagagagg cttccctggt 20

<210>16

<211>20

<212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400>16

caccacgatc accactcttg 20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar células madre pluripotentes o multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical que expresan ZNF281, que comprende los pasos de

(a) cultivar células mononucleares aisladas de la sangre de cordón umbilical en un recipiente de cultivo cubierto con fibronectina y que contiene un medio EGM-2™ o SNU-1, como se define en la Tabla 1, con suero bovino fetal (FBS), bFGF, ácido ascórbico, EGF, hidrocortisona, IGF-I, VEGF y heparina; y

(b) recolectar las células madre cultivadas del cultivo, en el que la célula madre está en un estado no diferenciado.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células mononucleares se aíslan mezclando sangre de cordón umbilical con Hetasep™ para agotar los eritrocitos y, posteriormente, utilizar Ficoll®-paque.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células madre se recolectan de colonias de células formadas 5-30 días después de ser cultivadas.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fibronectina se coloca en capas sobre el recipiente de cultivo o está contenida en forma de esferas o estructuras tridimensionales en un medio de cultivo.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células mononucleares se cultivan en un medio EGM-2™ o SNU-1, como se define en la Tabla 1, complementada con suero fetal bovino (FBS), 1-40 ng/ml de bFGF, 0,1-5,0 µg/ml de ácido ascórbico, 1-40 ng/ml de EGF, 0,1-1 µg/ml de hidrocortisona, 1-40 ng/ml de IGF-I, 1-5 ng/ml de VEGF y 20-25 µg/ml de heparina.

6. Células madre pluripotentes o multipotentes derivadas de la sangre de cordón umbilical que muestran una característica inmunológica positiva al factor de transcripción ZNF281, y una característica inmunológica negativa a la CD14, en las que las células madre pueden obtenerse cultivándolas en un medio EGM-2™ o SNU-1 como se define en la Tabla 1 suplementado con suero bovino fetal (FBS), 1-40 ng/ml de bFGF, 0,1-5,0 µg/ml de ácido ascórbico, 1-40 ng/ml de EGF, 0,1-1 µg/ml de hidrocortisona, 1-40 ng/ml de IGF-I, 1-5 ng/ml de VEGF y 20-25 µg/ml de heparina.

7. Las células madre derivadas de la sangre de cordón umbilical de la reivindicación 6, aisladas utilizando el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que tienen al menos una de las siguientes propiedades:

(a) muestran una característica inmunológica positiva al factor de transcripción c-myc;

(b) adherirse a una superficie recubierta con matriz extracelular y formar colonias celulares en forma de huso o esférica de 5 a 30 días después de la adhesión;

(c) muestran un CPDL (nivel de duplicación de la población acumulada) de 30 a 45;

(d) muestran una característica inmunológica negativa para CD31, CD34, CD45 y HLA-DR;

(e) capacidad para diferenciarse en células mesodérmicas, endodérmicas y ectodérmicas; y

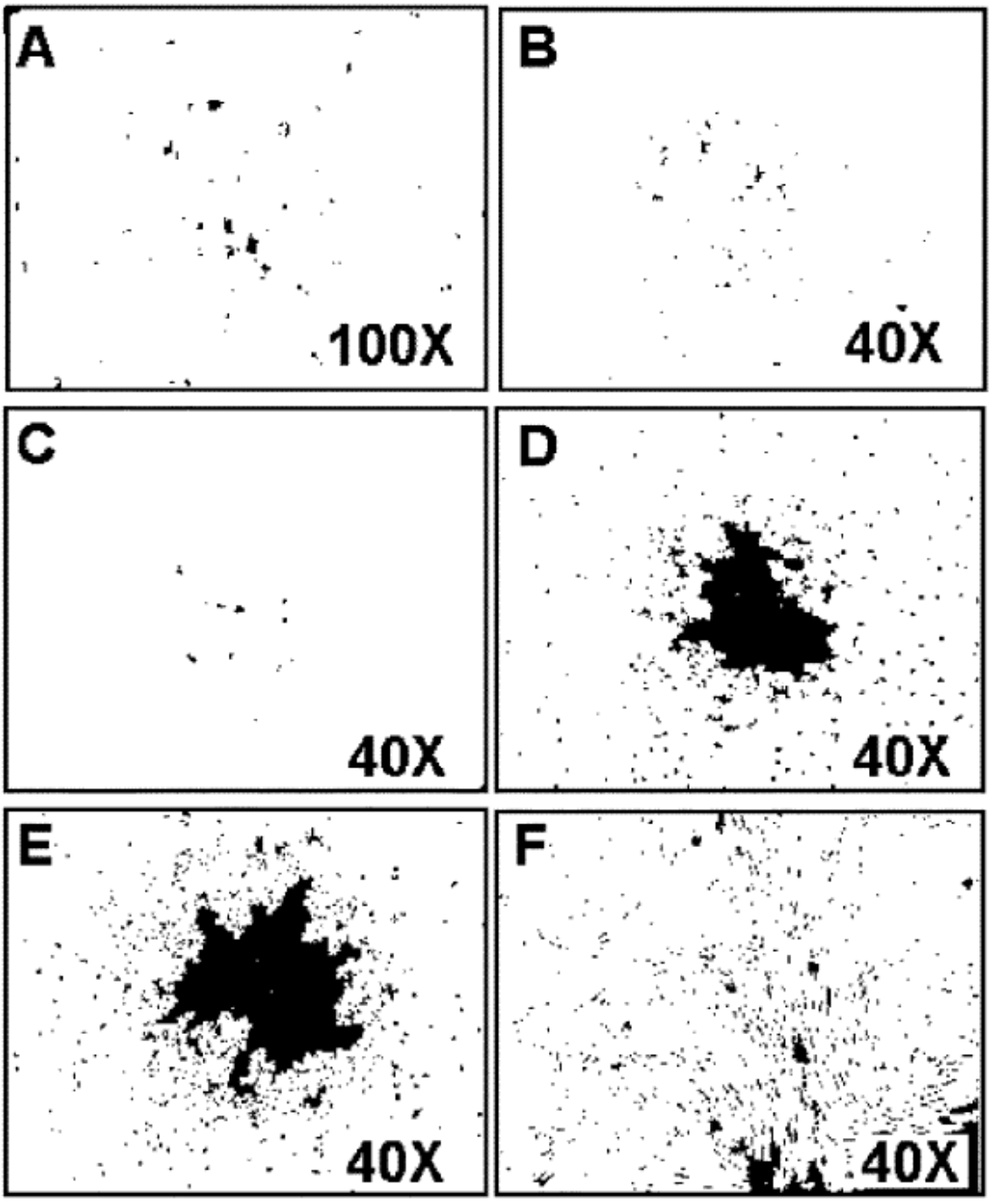
(f) secretan al menos una citoquina o quimioquina seleccionada del grupo que consiste en TIMP-2, TGF-β, RANTES CINC-3, EOTAXIN, GM-CSF, IFN-γ, IL-1b, IL-3, IL-6 , IL-8, IL-10, IL12p40, IL13, IL-16, IP-10, Leptina, MCP-2, MIG, MIP-3a, b-NGFm, sTNFRI y PFGF-bb.

8. Uso de un medio de cultivo para células madre, que comprende un medio EGM-2™ o SNU-1, como se define en la Tabla 1, suplementado con suero fetal bovino (FBS), 1-40 ng/ml de bFGF, 0,1-5,0 µg/ml, ácido ascórbico, 1-40 ng/ml de EGF, 0,1∼1 µg/ml de hidrocortisona, 1-40 ng/ml de IGF-I, 1-5 ng/ml de VEGF y 20-25 µg/ml de heparina en un procedimiento de la reivindicación 1.

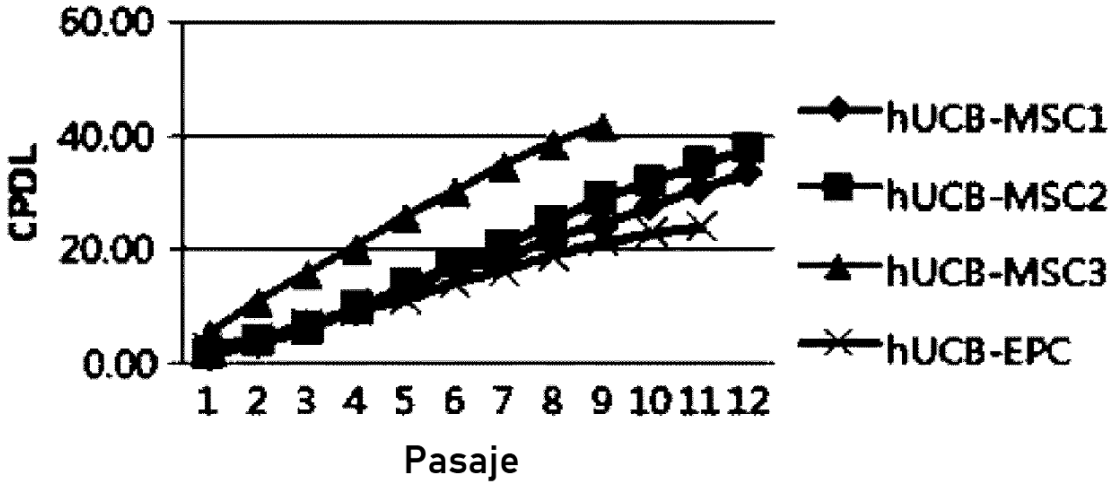
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de aumentar la capacidad de las células madre, utilizando un cultivo de esfera o un cultivo tridimensional de células madre.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que se usa una MEF (célula de fibroblasto embrionario de ratón) para el cultivo tridimensional.

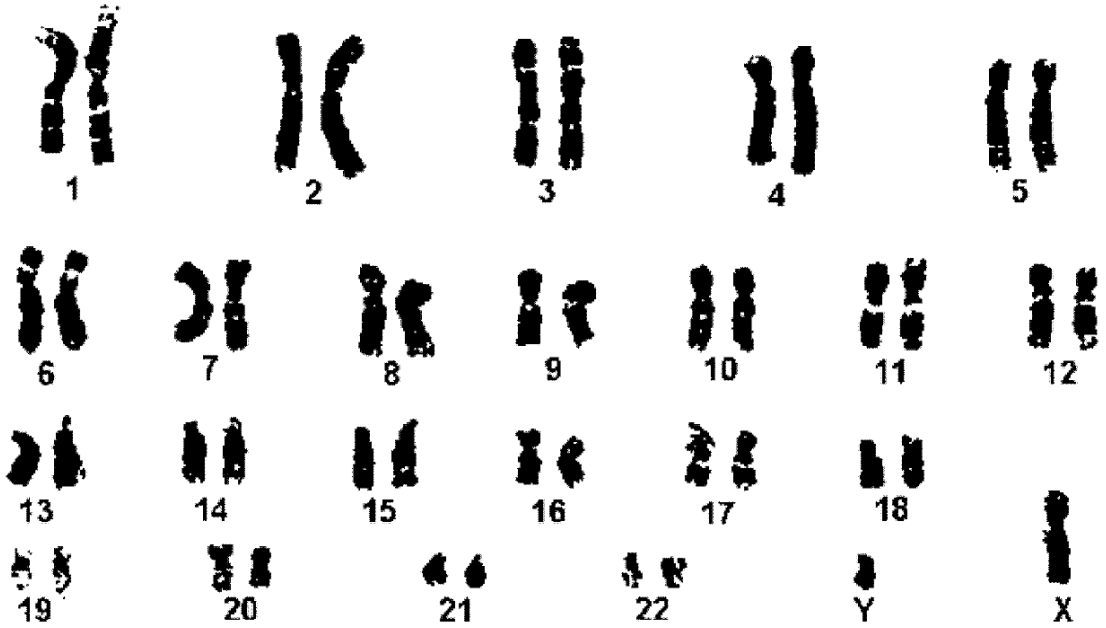
[Fig. 1]



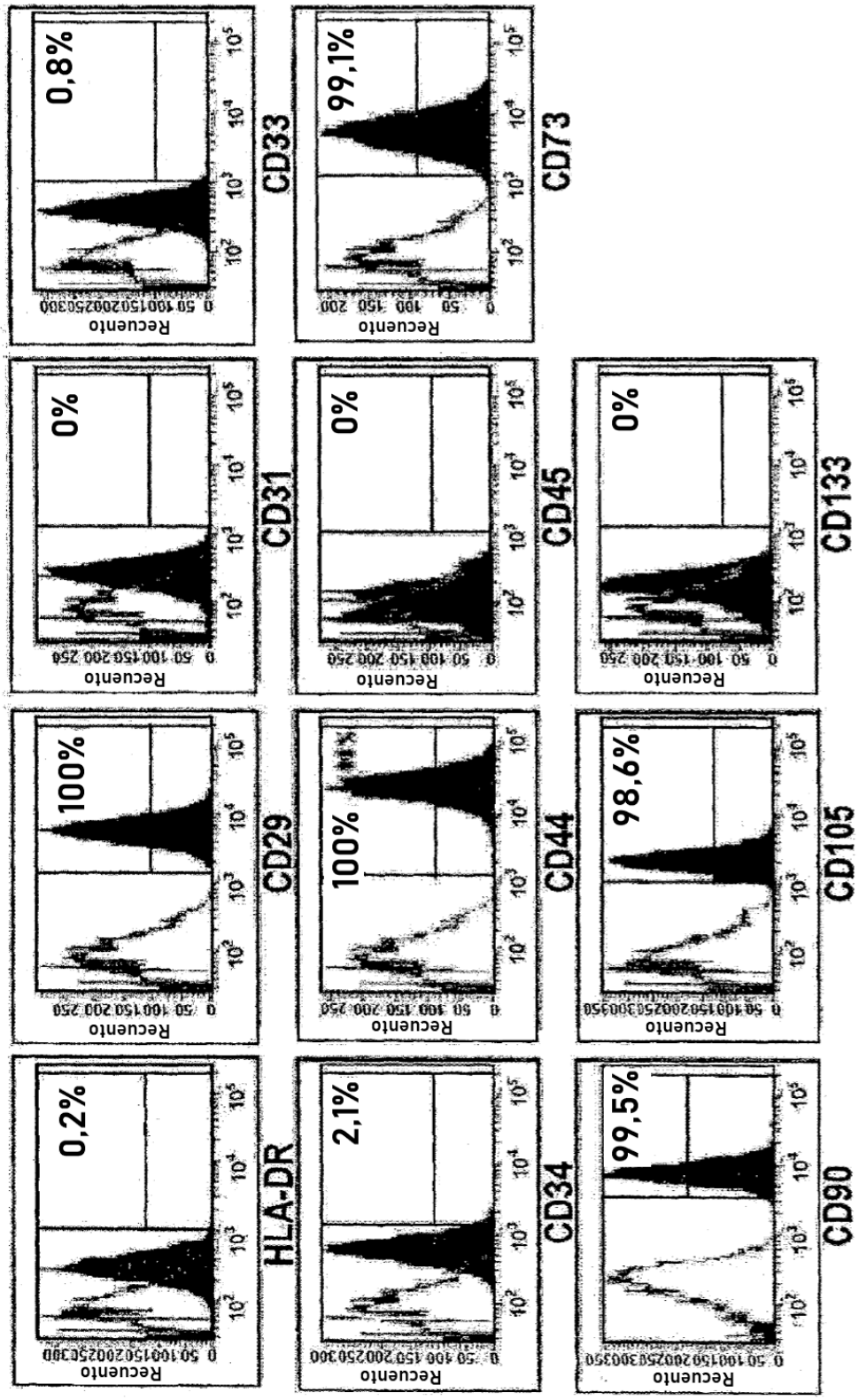
[Fig. 2]


60.00
40.00
20.00
0.00
CPDL
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Pasaje
hUCB-MSC1
hUCB-MSC2
hUCB-MSC3
hUCB-EPC

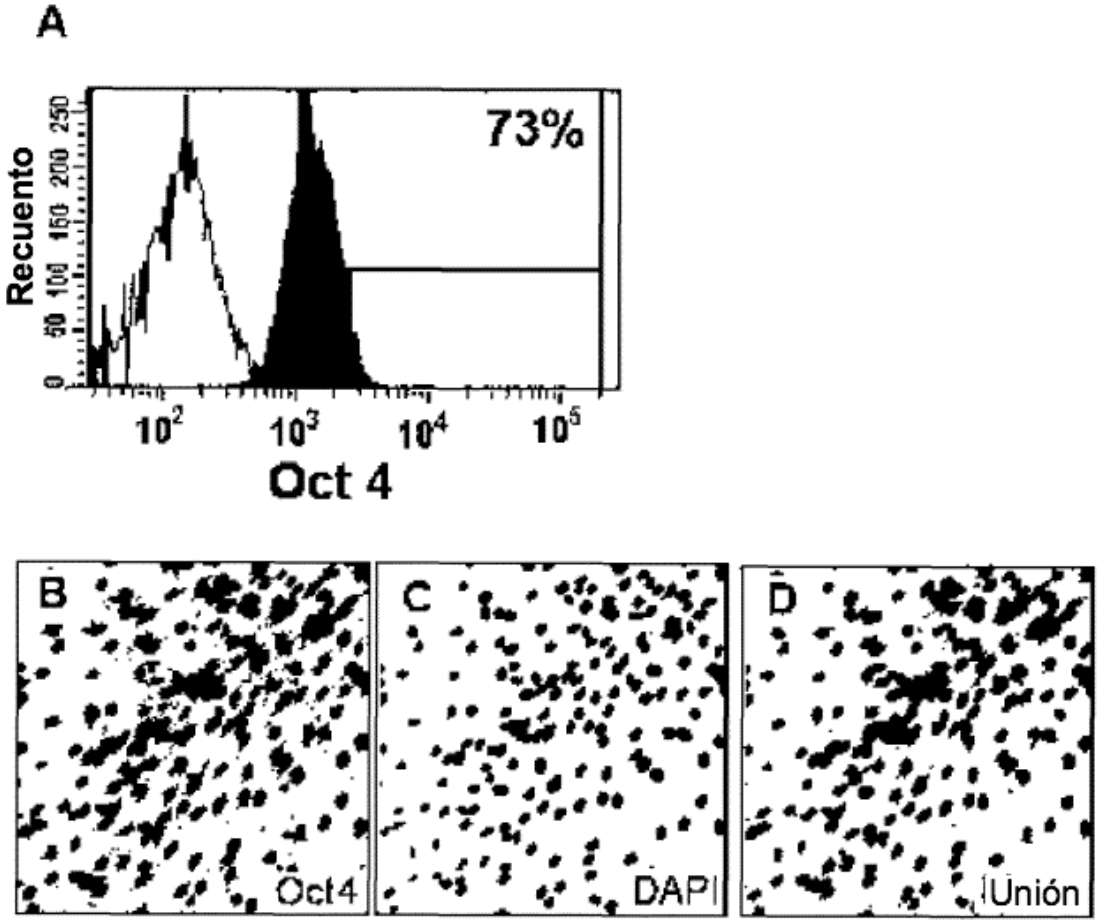
[Fig. 3]


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
Y
X

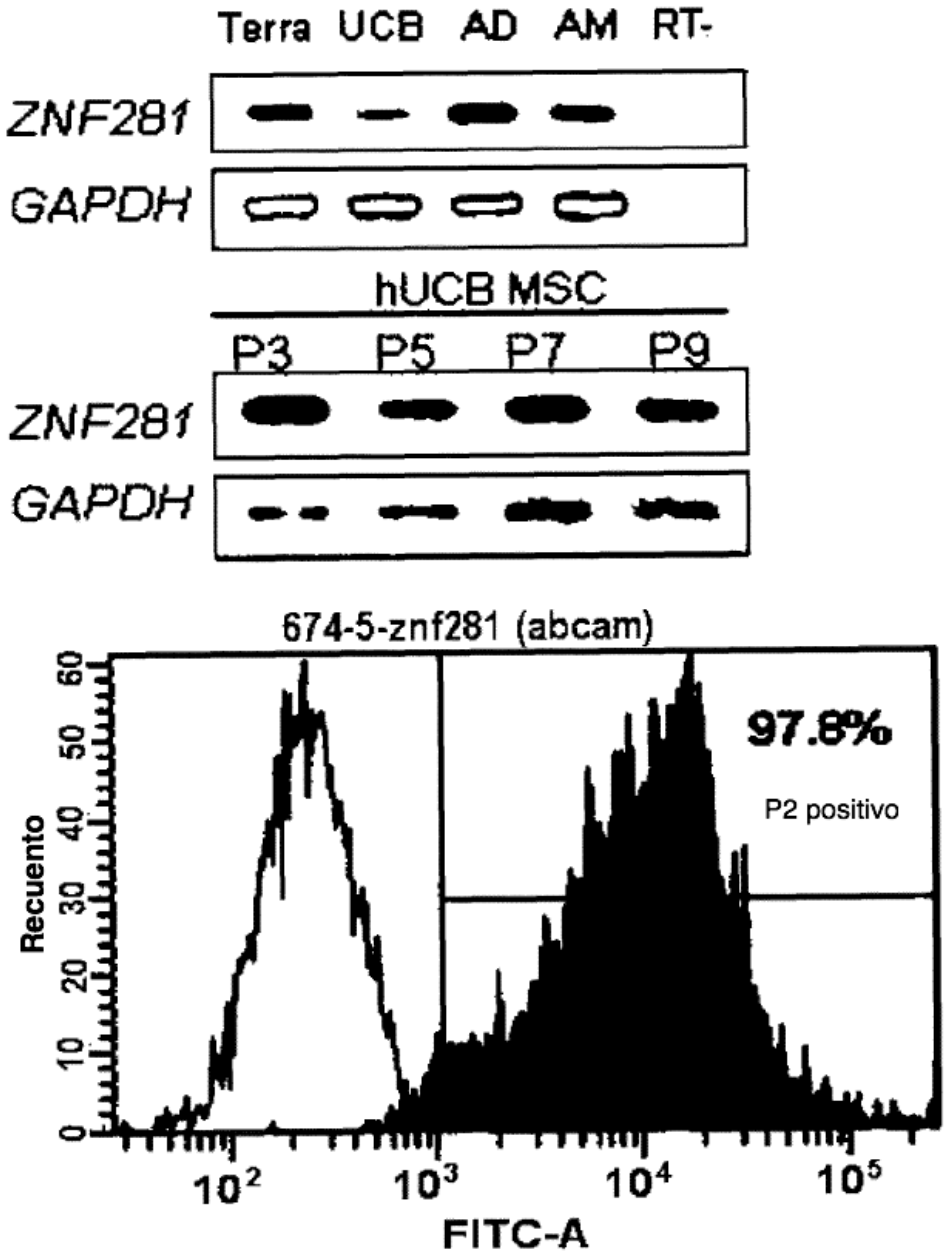
[Fig. 4]


0,8%
CD33
99,1%
CD73
0%
CD31
0%
CD45
0%
CD133
100%
CD29
100%
CD44
98,6%
CD105
0,2%
HLA-DR
2,1%
CD34
99,5%
CD90
Recuento

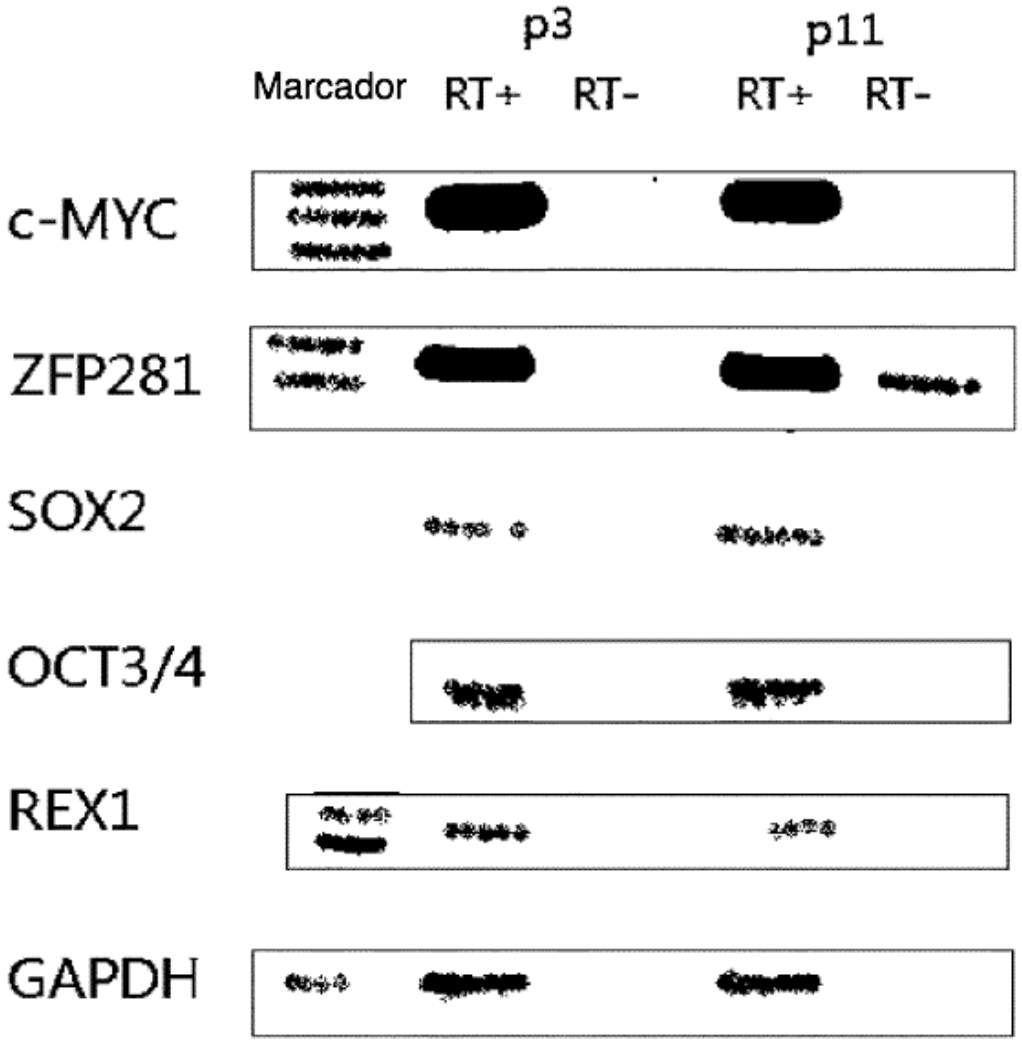
[Fig. 5]


A
73%
Recuento
0
50
100
150
200
250
10^2
10^3
10^4
10^5
Oct 4
B
Oct4
C
DAPI
D
Unión

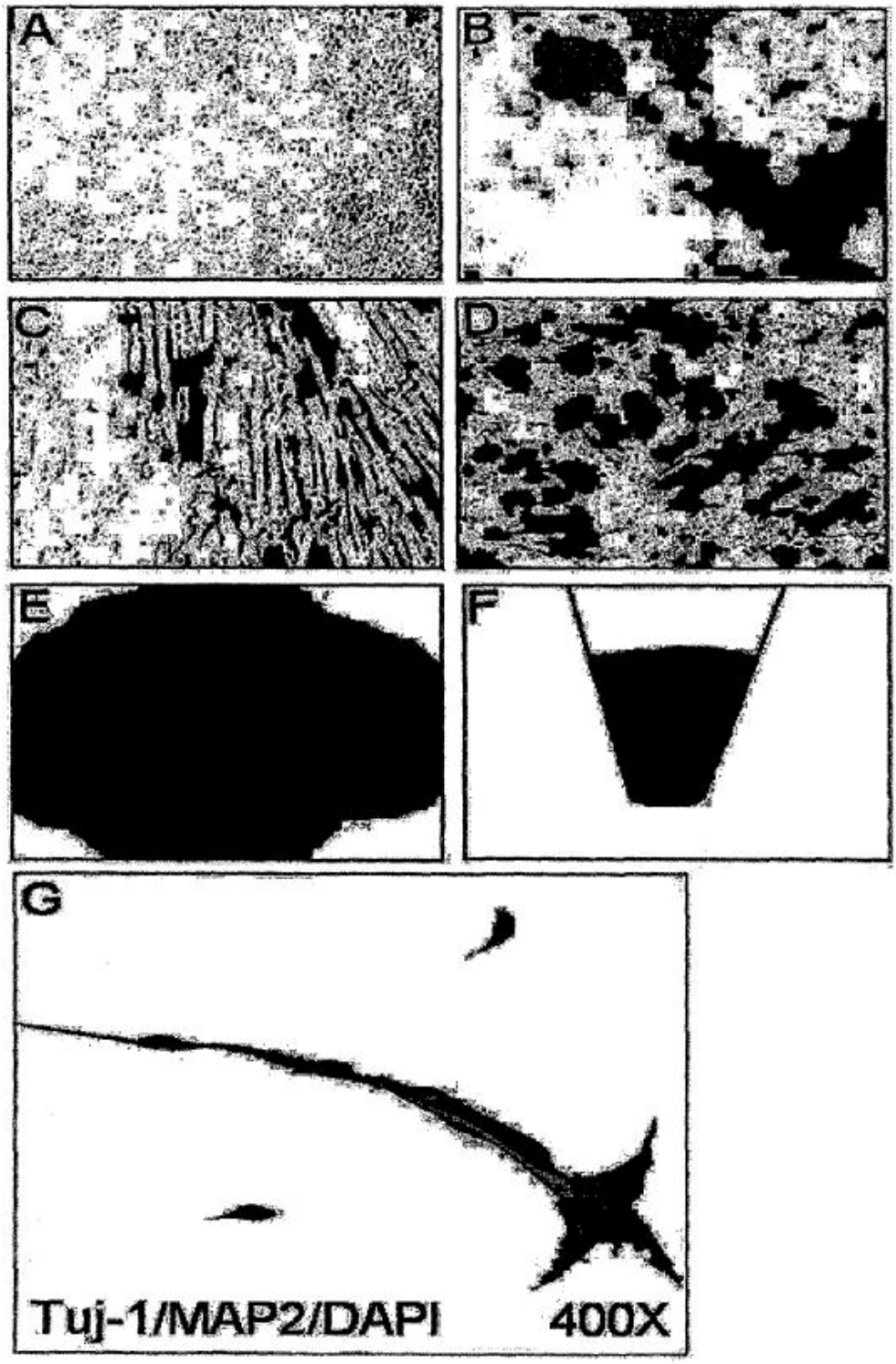
[Fig. 6]


Terra UCB AD AM RT-
ZNF281
GAPDH
hUCB MSC
P3 P5 P7 P9
ZNF281
GAPDH
674-5-znf281 (abcam)
97.8%
P2 positivo
Recuento
0 10 20 30 40 50 60
10^2 10^3 10^4 10^5
FITC-A

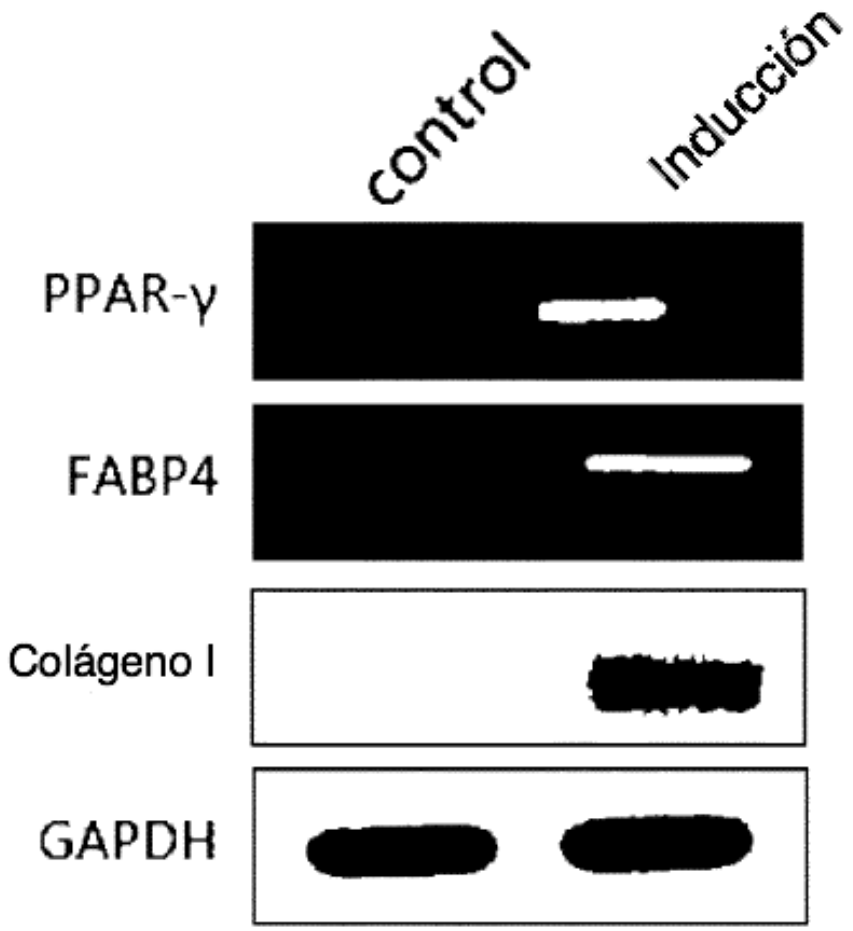
[Fig. 7]



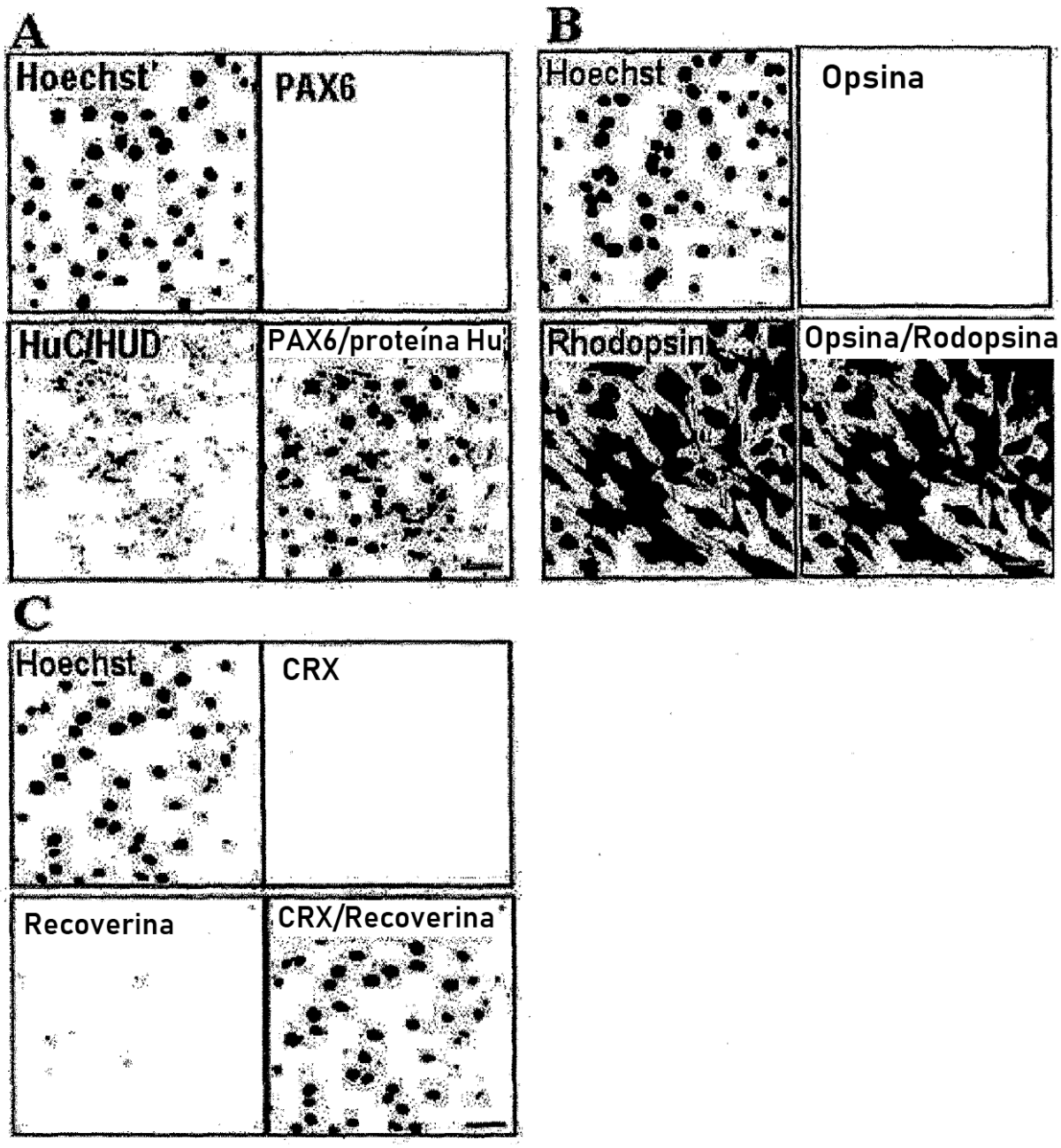
[Fig. 8]



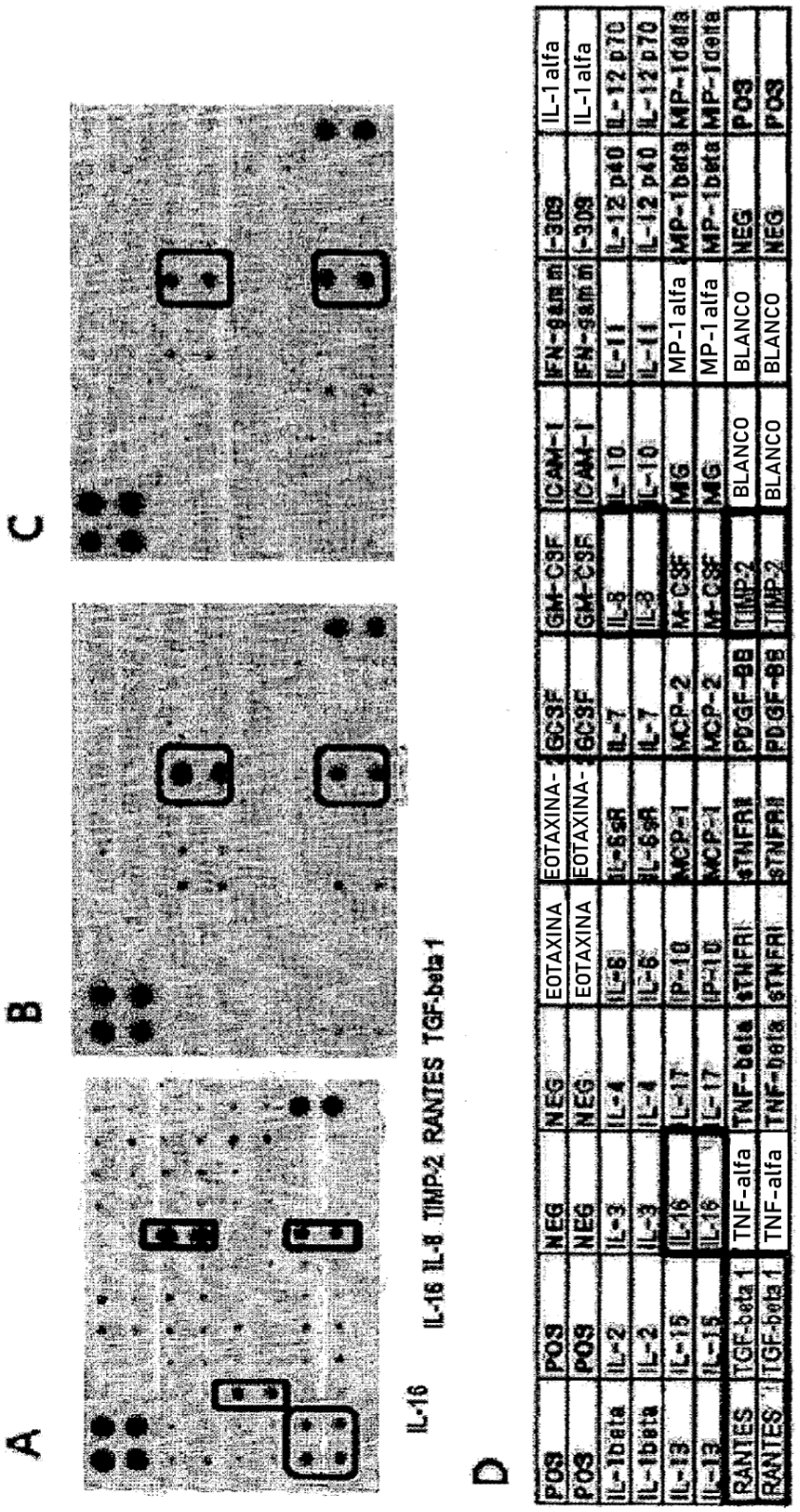
[Fig. 9]



[Fig. 10]

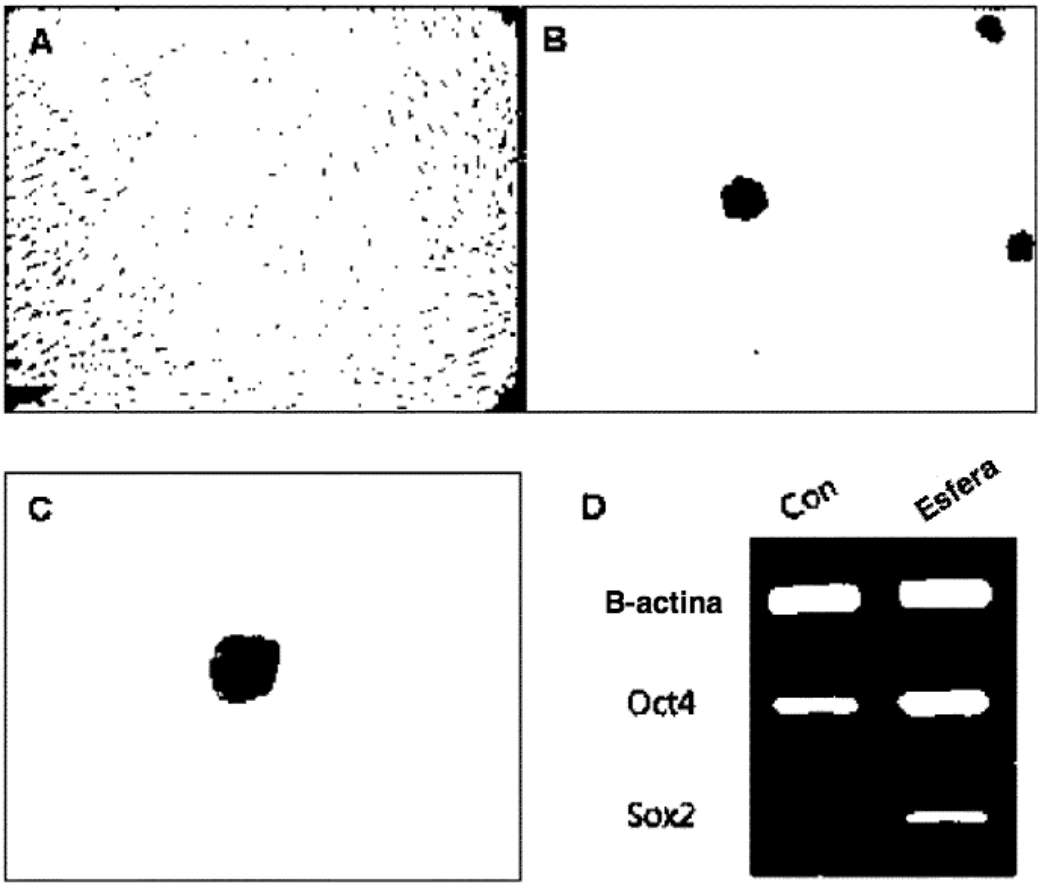
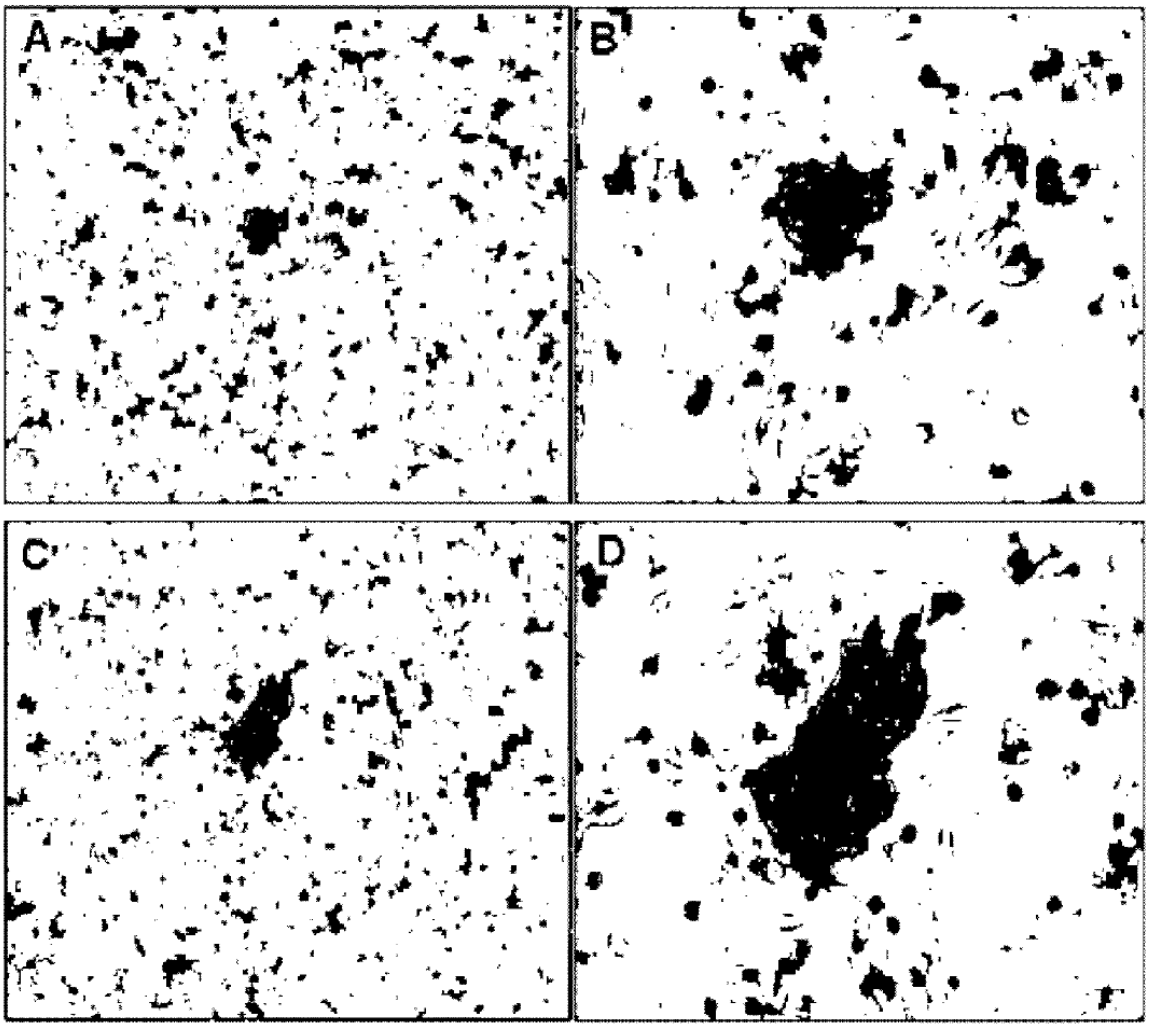

A
Hoechst
PAX6
HuC/HUD
PAX6/proteína Hu
B
Hoechst
Opsina
Rhodopsin
Opsina/Rodopsina
C
Hoechst
CRX
Recoverina
CRX/Recoverina

[Fig. 11]



POS	POS	NEG	NEG	EOTAXINA	EOTAXINA-1	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	IFN-gamma	I-309	IL-1 alfa
POS	POS	NEG	NEG	EOTAXINA	EOTAXINA-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	IFN-gamma	I-309	IL-1 alfa
IL-1beta	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
IL-1beta	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MP-1 alfa	MP-1beta	MP-1delta
IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MP-1 alfa	MP-1beta	MP-1delta
RANTES	TGF-beta 1	TNF-alfa	TNF-beta	sTNFRI	sTNFRII	PDGF-BB	TIMP-2	BLANCO	BLANCO	NEG	POS
RANTES	TGF-beta 1	TNF-alfa	TNF-beta	sTNFRI	sTNFRII	PDGF-BB	TIMP-2	BLANCO	BLANCO	NEG	POS

[Fig. 12]



[Fig. 13]