

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 860**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

A61K 35/48 (2015.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2009 PCT/KR2009/006267**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11052818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2009 E 09850889 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2495311**

54 Título: **Procedimiento de producción de células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas y células madre mesenquimales producidas por el mismo**

30 Prioridad:

27.10.2009 KR 20090102458

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

06.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIM, HYO SOO;
KANG, HYUN JAE;
LEE, EUN JU y
PARK, YOUNG BAE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 729 860 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas y células madre mesenquimales producidas por el mismo

Antecedentes de la invención

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para inducir células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas, células madre mesenquimales producidas por el procedimiento y productos de terapia celular que incluyen células madre mesenquimales.

Discusión de los antecedentes

10 Las células madre son células que son capaces de diferenciarse en una variedad de células que constituyen tejidos de un organismo, y en general se refieren a células no diferenciadas antes de la diferenciación, que pueden obtenerse de los tejidos respectivos de un embrión, un feto y un cuerpo adulto. Las células madre se diferencian en células específicas por un estímulo de diferenciación (medio ambiente); permitiendo su proliferación (expansión) produciendo las mismas células como sí mismas a través de la división celular (autorrenovación), a diferencia de las
 15 células cuya división celular ha cesado debido a la finalización de la diferenciación; y teniendo plasticidad en la diferenciación, ya que pueden diferenciarse en otras células en diferentes entornos o mediante diferentes estímulos de diferenciación.

Las células madre pueden clasificarse en células madre pluripotentes, multipotentes y unipotentes de acuerdo con su capacidad de diferenciación. Las células madre pluripotentes son células pluripotentes que tienen pluripotencia para diferenciarse en todas las células, e incluyen células madre embrionarias (células ES) y células madre pluripotentes inducidas (células iPS), etc. Las células madre adultas pueden ser ejemplos de células madre multipotentes y/o unipotentes.

En la técnica anterior se describen células madre embrionarias que se forman a partir de la masa celular interna de blastocitos en la embriogénesis temprana; tienen pluripotencia para diferenciarse en casi todas las células para que puedan diferenciarse en casi cualquier tipo de células de tejido; se puede cultivar en un estado inmortal e indiferenciado; puede heredarse a la siguiente generación mediante la preparación de células germinales, a diferencia de las células madre adultas (Thomson et al., Science, 282; 1145-1147, 1998; Reubinoff et al., Nat, Biotechnol., 18; 399-404, 2000).

Las células madre embrionarias humanas se preparan en la técnica anterior aislando y cultivando solo la masa celular interna en el momento de conformar la formación de un embrión humano y, actualmente, las células madre embrionarias humanas preparadas globalmente se obtienen en la técnica anterior a partir de los embriones congelados que permanecen después de las operaciones de esterilización. Ha habido varios intentos de usar células madre embrionarias pluripotentes humanas que pueden diferenciarse en todas las células como un producto de terapia celular; sin embargo, aún no han superado por completo las barreras elevadas, como el riesgo de carcinogénesis y el rechazo inmunológico.

Como un complemento de estas, se han reportado recientemente células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células iPS, que se incluyen en el concepto de las células madre pluripotentes, son células obtenidas mediante la diferenciación de las células adultas, cuya diferenciación se termina de varias maneras y, por lo tanto, las devuelve al estado de tipo embrionario en una etapa temprana de diferenciación. Hasta ahora, se ha informado que las células desdiferenciadas exhiben casi las mismas características que las células madre embrionarias, que son células madre pluripotentes, en vista de la capacidad de expresión y diferenciación de genes. Estas células iPS también pueden usar células autólogas y, por lo tanto, excluyen el riesgo de rechazo inmunológico, sin embargo, el riesgo de tumorigénesis aún permanece como un asunto por resolver.

Recientemente, las células madre mesenquimales que tienen una función inmunorreguladora y están libres del riesgo de tumorigénesis, se han presentado como una alternativa para resolver tales problemas. Las células madre mesenquimales son células multipotentes que pueden diferenciarse en adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos, neurocitos, cardiomiocitos, etc., y se ha informado que tienen la función de regular las respuestas inmunitarias. Las células madre mesenquimales se pueden aislar y cultivar a partir de diversos tejidos, pero su capacidad y los marcadores de la superficie celular son diferentes entre sí según los orígenes de los mismos. Por lo tanto, no es fácil definir claramente las células madre mesenquimales. Sin embargo, las células madre mesenquimales se definen generalmente por células que pueden diferenciarse en osteocitos, condrocitos y miocitos; tener una forma en espiral; y exprese CD73(+), CD105(+), CD34(-) y CD45(-), que son marcadores básicos de la superficie celular.

Mientras tanto, debe satisfacerse el número mínimo de aproximadamente 1×10^9 de células requeridas en los campos de la medicina regenerativa y/o la terapia celular, para que las células madre mesenquimales se usen como productos de terapia celular. Sin embargo, el número de células realmente requeridas se incrementa aún más, al considerar experimentos para establecer condiciones y estándares. Por lo tanto, se necesitan al menos 10 pases

para un experimento in vitro con el fin de suministrar dicha cantidad de células madre mesenquimales existentes derivadas de diversos orígenes. En este caso, las células envejecen y se modifican, y, por lo tanto, pueden dejar de ser adecuadas para el uso como productos de terapia celular. Aunque las condiciones y los estándares se han establecido mediante el uso de estas células, pueden surgir algunos problemas de que las células pueden agotarse antes de que se utilicen realmente en la terapia, por lo que deben utilizarse células madre mesenquimales de otros, y en ese caso es necesario realizar experimentos adicionales debido al uso de diferentes células. En Arpornmaeklong et al., Stem Cells and Development, vol. 18, 7, 2009, 955-967 se describe la caracterización fenotípica, la diferenciación osteoblástica y la capacidad de regeneración ósea de las células madre mesenquimales derivadas de células madre embrionarias humanas. En particular, para entender los patrones de diferenciación y la capacidad de formación ósea de las hESC, se determinó el patrón temporal de la diferenciación osteoblástica de las células madre mesenquimales derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC-MSC), la influencia de la matriz tridimensional en la diferenciación osteogénica de hESC-MSC en cultivo a largo plazo y la capacidad de formación de hueso de las células similares a osteoblastos derivadas de hESC-MSC en defectos calvariales.

La alternativa más ideal para resolver los problemas anteriores del sistema de cultivo de células madre mesenquimales existente es utilizar células madre pluripotentes humanas para producir células madre mesenquimales. Sin embargo, hasta ahora, la inducción de la diferenciación de las células madre pluripotentes humanas en células madre mesenquimales había requerido un procedimiento de inducción por una citoquina específica (por ejemplo, BMP, bFGF), que cuesta mucho y necesita control de concentración, o un procedimiento de inducción en xenoalimentadores (líneas celulares de ratón OP9) que tienen el riesgo de xenopatógeno, y una clasificación por un marcador específico (por ejemplo, CD73), a partir de ese momento.

Además, en cuanto a las células madre mesenquimales producidas por estos procedimientos, es difícil mantener su estado fundamental y la eficiencia de producción no es alta. Además, las células madre pluripotentes humanas que tienen diferentes antecedentes genéticos tienen diferentes mecanismos fisiológicos y, por lo tanto, no pueden utilizar los procedimientos existentes para inducir la diferenciación de las células madre mesenquimales, que se establecieron previamente en líneas específicas. Por lo tanto, hubo cierta dificultad en que para inducir células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas que tienen diferentes orígenes genéticos, es necesario desarrollar y aplicar procedimientos separados que induzcan a la diferenciación. Por estas razones, las células madre mesenquimales tienen limitaciones para ser utilizadas como productos de terapia celular ideales en los campos de la medicina regenerativa y la terapia celular.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de producción en masa de células madre mesenquimales con alta eficiencia, que generalmente es aplicable a células madre pluripotentes humanas que tienen diversos antecedentes genéticos. Además, la presente invención describe células madre mesenquimales producidas por el procedimiento, productos de terapia celular que incluyen las células madre mesenquimales y un sistema de cultivo estandarizado para producir las células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas.

Para resolver el problema anterior, la presente invención proporciona un procedimiento para producir células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas, comprendiendo el procedimiento: a) cultivar células madre pluripotentes humanas en un estado de suspensión en un medio libre de factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF) durante 14 días para formar cuerpos embrionarios; b) unir los cuerpos embrionarios de la etapa a) a una placa de cultivo y cultivar los cuerpos embrionarios en componentes básicos del Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene suero fetal bovino (FBS) sin agregar citoquinas externas para inducir la diferenciación de los cuerpos embrionarios en células madre mesenquimales; y c) cultivar proliferativamente las células madre mesenquimales mientras se mantiene la identidad de las células madre mesenquimales. Específicamente, en una realización, la citoquina es una proteína morfogénica ósea (BMP) o un factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). En una realización adicional, las células madre mesenquimales de la etapa c) se cultivan utilizando un medio que contiene factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos humano básico (hFGF-B), insulina como factor de crecimiento (IGF-1), hidrocortisona y ácido ascórbico. En otra realización más, las células madre mesenquimales de la etapa c) pueden diferenciarse en células seleccionadas del grupo que consiste en adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos, neurocitos y cardiomiocitos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la inducción de la diferenciación en células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas y su cultivo proliferativo.

La Figura 1B muestra los resultados de la cuantificación de una diferencia en la expresión génica asociada con la diferenciación mesenquimal de cuerpos embrionarios de 7 días y cuerpos embrionarios de 14 días mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa.

La Figura 1C muestra los resultados de confirmación de la expresión de proteínas de los genes en la etapa temprana de la diferenciación mesenquimal mediante la tinción de cuerpos embrionarios de 14 días.

La Figura 2A muestra la clasificación de los cuerpos embrionarios el día 14 en el momento de la unión.

La Figura 2B muestra que la inducción de la diferenciación en células madre mesenquimales se inicia cuando los cuerpos embrionarios se cultivan en un medio de cultivo general, que no agrega citoquinas externas.

5 Las Figuras 2C y 2D muestran el proceso de inducción de la diferenciación en células madre mesenquimales en un grupo no tratado y tratado con Noggin que es antagonista de BMP, respectivamente.

La Figura 3 muestra una diferencia en la eficiencia entre un medio EGM-2MV y un medio á-MEM, que es el medio existente para el cultivo de células madre mesenquimales, confirmado por la tinción de beta-gal asociada con la senescencia celular.

10 La Figura 4A muestra un patrón de crecimiento de células madre mesenquimales cultivadas en el medio EGM-2MV durante 140 días o más.

La Figura 4B es una curva de crecimiento de células madre mesenquimales de la presente invención que muestra que crecen mientras mantienen su actividad a largo plazo cuando se cultivan in vitro.

Las Figuras 5A y 5B muestran que las células madre mesenquimales obtenidas por el procedimiento de la presente invención expresan marcadores específicos mesenquimales.

15 La Figura 6 muestra los resultados del análisis cromosómico de la célula madre mesenquimal de la presente invención después de un cultivo in vitro a largo plazo de la misma.

Las Figuras 7A y 7B muestran resultados de análisis de la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención;

20 Las Figuras 8A y 8B muestran si se forma o no un teratoma y los factores asociados con la inducción inmune se expresan, mediante la célula madre mesenquimal obtenida por el procedimiento de la presente invención;

La Figura 9 muestra los resultados obtenidos al observar la función utilizando un modelo de ratón con enfermedad cardiovascular isquémica para estimar la funcionalidad de las células madre mesenquimales obtenidas por el procedimiento de la presente invención;

25 La Figura 10 muestra resultados experimentales sobre la posibilidad de que las células madre mesenquimales obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención como alimentadores autólogos; y

30 La Figura 11 muestra los resultados de la verificación de la reproducibilidad de la presente invención utilizando la línea de células madre embrionarias humanas No. 3 de Cha Medical Center (CHA3-hESC) y la línea de células madre embrionarias H9 humanas, que tienen diferentes antecedentes genéticos y entornos de cultivo de las células madre embrionarias humanas del Hospital de la Universidad Nacional de Seúl.

Descripción detallada de las realizaciones ilustradas

35 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas, comprendiendo el procedimiento: a) cultivar células madre pluripotentes humanas en un estado de suspensión en un medio libre del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) para 14 días para formar cuerpos embrionarios; b) unir los cuerpos embrionarios de la etapa a) a un disco de cultivo y cultivar los cuerpos embrionarios en componentes básicos del Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene suero fetal bovino (FBS) sin agregar citoquinas externas para inducir la diferenciación de los cuerpos embrionarios en células madre mesenquimales; y c) cultivar proliferativamente las células madre mesenquimales mientras se mantiene la identidad de las células madre mesenquimales. Específicamente, la presente invención puede incluir la formación de los cuerpos embrionarios de las células madre pluripotentes humanas, y esto puede llevarse a cabo por un procedimiento general conocido en la técnica. Por ejemplo, las células madre pluripotentes humanas pueden tratarse con proteasa, y luego cultivarse en un estado de suspensión en un medio de células madre embrionarias libre del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

45 El término "células madre", como se usa en el presente documento, se refiere a las células maestras que pueden regenerar ilimitadamente las células para formar células especializadas de tejidos y órganos. Las células madre son células multipotentes o pluripotentes desarrollables. La célula madre puede dividirse en dos células madre hijas, o una célula madre hija y una célula de tránsito, y posteriormente proliferan para madurar y completar el tipo de células de tejido. Estas células madre pueden ser clasificadas por varios procedimientos. Uno de los procedimientos más utilizados depende de la capacidad de diferenciación de las células madre. De acuerdo con el procedimiento, las células madre pueden clasificarse en células madre pluripotentes que se pueden diferenciar en células de la capa de tres gérmenes, células madre multipotentes que se pueden diferenciar de manera limitada en una capa germinal específica o más, y células madre unipotentes que se pueden diferenciar solo en una capa germinal específica.

El término "células madre pluripotentes", como se usa en el presente documento, se refiere a las células madre que tienen pluripotencia, que son capaces de diferenciarse en las tres capas germinales que constituyen un cuerpo vivo, y sus ejemplos incluyen células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células madre adultas pueden ser células madre multipotentes o unipotentes.

5 El término "diferenciación", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso por el cual las células se especializan en la estructura o función durante la división, proliferación y crecimiento de las células, es decir, el cambio de morfología o función de las células para que las células, tejidos, etc., de un organismo realicen trabajos determinados. En general, es un proceso en el que un sistema relativamente simple se separa en dos o más sistemas parciales cualitativamente diferentes. La diferenciación se refiere a un estado en el que partes de un
10 determinado biosistema, que al principio han sido homogéneas, se distinguen cualitativamente entre sí, o como resultado de ello, se dividen en partes o sistemas parciales que se pueden distinguir cualitativamente, tales como, por ejemplo, en términos de ontogénesis, un huevo, que al principio era homogéneo, se distinguía en cabeza, cuerpo, etc. o las células como miocitos, neurocitos, etc. se distinguían entre sí.

15 El término "cuerpo embrionario (EB)" como se usa en el presente documento se refiere a un agregado formado por la inducción de la diferenciación de las células madre pluripotentes. El cuerpo embrionario puede generarse cuando las células madre pluripotentes se cultivan en un estado de suspensión sin alimentadores en un medio de células madre embrionarias libre de un factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Se ha informado que el cuerpo embrionario preparado mediante el procedimiento anterior puede diferenciarse en todas las células necesarias para la formación de un individuo a partir del endodermo, mesodermo y ectodermo, y esto corresponde a uno de los
20 procedimientos in vitro que demuestran la pluripotencia de las células madre pluripotentes.

La presente invención puede incluir seleccionar cuerpos embrionarios en el día 14 de cultivo e inducir la diferenciación de los cuerpos embrionarios en las células madre mesenquimales. Específicamente, los cuerpos embrionarios en el día 14 de cultivo, que se forman cultivando las células madre pluripotentes humanas en un estado de suspensión en un medio de células madre embrionarias libres de bFGF, pueden seleccionarse y luego
25 usarse en la producción de las células madre mesenquimales. Los cuerpos embrionarios en el día 7 de cultivo se usaron generalmente en los procedimientos existentes para inducir la diferenciación en las células madre mesenquimales de las células madre pluripotentes humanas (generalmente células madre embrionarias humanas). Sin embargo, los presentes inventores encontraron que la selección de los cuerpos embrionarios en el día 14 de cultivo en lugar de los cuerpos embrionarios en el día 7 de cultivo puede aumentar la eficiencia de inducción de diferenciación en vista de la producción de células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas. Específicamente, como los resultados del estudio de la expresión génica de los cuerpos embrionarios en el día 7 y en el día 14 de cultivo, se confirmó que los genes asociados con la diferenciación mesenquimal temprana (braquiosis, BMPR, etc.) y Sox 17, que es un gen importante en las células mesenquimales cardíacas tempranas, se expresan notablemente en los cuerpos embrionarios en el día 14 de cultivo, en comparación con los cuerpos
30 embrionarios existentes en el día 7 de cultivo (véase la Figura 1B). Se observa a partir de los resultados anteriores que la selección de los cuerpos embrionarios en el día 14 de cultivo puede inducir una diferenciación preferencial en las células madre mesenquimales.

Además, la presente invención puede incluir unir los cuerpos embrionarios en el día 14 de cultivo a una placa de cultivo de tejidos, y luego inducir la diferenciación espontánea de los cuerpos embrionarios en células madre mesenquimales. Cuando se induce la diferenciación en las células madre mesenquimales de las células madre pluripotentes humanas, es normal iniciar la inducción de la diferenciación mediante la adición externa de proteína morfogénica ósea (BMP)-2, etc. Los presentes inventores encontraron que la diferenciación espontánea en las células madre mesenquimales se indujo cuando los cuerpos embrionarios se cultivaron utilizando un medio de cultivo celular general como el medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), etc. sin la adición externa de BMP-2, etc. (véase, Figura 2B). En relación con este mecanismo, los presentes inventores consideraron la posibilidad de la formación de autobucle de BMP, que es un factor inductor de células madre mesenquimales, conocido en la técnica relacionada, y luego, para probar esto, observó un proceso de inducción de diferenciación de las células madre mesenquimales a través del tratamiento con Noggin, que es un antagonista de BMP (véase, Figuras 2C y 2D). La diferenciación en las células madre mesenquimales se indujo en un grupo no tratado con Noggin (véase, Figura 2C). Sin embargo, se observó que las células progenitoras mesenquimales no aparecen en un grupo tratado con Noggin (véase, Figura 2D), y también, en el momento del cultivo pasado, el cultivo celular era imposible ya que las células no se podían volver a unir. Se puede ver a partir de los resultados anteriores que, cuando los cuerpos embrionarios en el día 14 de cultivo se cultivan en un medio de cultivo general después de la unión de los mismos, se induce una diferenciación espontánea en las células madre mesenquimales incluso sin la adición externa de citoquinas, y esto se debe a la autorregulación por un sistema de bucle BMP.
55

Además, la presente invención puede incluir mantener y cultivar proliferativamente las células madre mesenquimales inducidas por diferenciación utilizando un medio que contiene citoquina. En la presente invención, un medio de células endoteliales microvasculares-2 (EGM-2MV, Lonza; Basilea, Suiza) medio que contiene factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos humano básico (hFGF) B), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), la hidrocortisona y ácido ascórbico, etc., se utilizaron como medio de cultivo de las células madre mesenquimales. Los presentes inventores encontraron que la actividad de las células madre mesenquimales se mantuvo relativamente más larga en su cultivo in vitro,
60

cuando se utilizó el medio EGM-2MV en lugar del medio α -MEM que se ha utilizado ampliamente como el medio de cultivo de células madre mesenquimal existente.

Para utilizar las células madre mesenquimales como productos de terapia celular, se debe colocar primero una cantidad suficiente de células como se describió anteriormente, y para ese propósito, se necesita un cultivo pasado de las células madre mesenquimales. Sin embargo, los cultivos pasados repetidos pueden causar la senescencia de las células madre mesenquimales, lo que resulta en un deterioro de la capacidad de división de las mismas y, por lo tanto, puede perderse su actividad (capacidad de diferenciación). A este respecto, se confirmó que el medio EGM-2MV de la presente invención tenía una capacidad de retención de actividad superior, en comparación con el medio α -MEM que se ha utilizado como el medio de cultivo de células madre mesenquimal existente (véase, Figura 3). Específicamente, como resultado de llevar a cabo la tinción de beta gal mediante la cual las células se tiñen en el momento de su senescencia, se ha observado que se realizó la tinción de beta gal de más células y el tamaño de las células se hizo notablemente más grande en el cultivo de células madre mesenquimal, utilizando el medio α -MEM que en las células madre mesenquimales cultivadas utilizando el medio EGM-2MV. En general, se sabe que, en el momento del cultivo in vitro de células madre, el no crecimiento de las mismas debido a la senescencia celular está asociado con el agrandamiento de las células. Esto significa que, cuando las células madre mesenquimales se cultivan utilizando el medio α -MEM, la senescencia de las células madre mesenquimales se acelera y, por lo tanto, se pierde la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales.

Además, la presente descripción proporciona células madre mesenquimales producidas por el procedimiento de la presente invención. Las células madre mesenquimales se pueden diferenciar en osteocitos, condrocitos y miocitos, etc., y se definen por una forma espiral, y el grado de expresión de los marcadores de la superficie celular básica, SH2(+), SH3(+), CD34(-), y CD45(-). Las células madre mesenquimales derivadas de células madre embrionarias humanas del Hospital de la Universidad Nacional de Seúl (Asian #1, masculino, alimentador STO) obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención obtuvieron los mismos resultados en tres ensayos diferentes, los cuales fueron confirmados por un clasificador de células activadas por fluorescencia y por diferenciación funcional.

La presente descripción de la invención proporciona un procedimiento estandarizado para inducir la diferenciación y el cultivo proliferativo, que puede usarse generalmente para producir células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas que tienen diversos orígenes genéticos. A este respecto, el procedimiento de la presente invención se realizó en células madre embrionarias humanas de Cha Medical Center (Asian #2, masculino, alimentador de MEF) y células madre embrionarias humanas H9 (Westerner, hembra, alimentador de MEF), que tienen diferentes orígenes genéticos de las células madre embrionarias humanas del Hospital de la Universidad Nacional de Seúl, y los mismos resultados se obtuvieron de allí. Es decir, el procedimiento estandarizado de la presente invención se puede usar generalmente para inducir la diferenciación de las células madre mesenquimales de células madre pluripotentes humanas que tienen diversos antecedentes genéticos y/o entornos de cultivo.

Además, la presente invención describe productos de terapia celular que incluyen las células madre mesenquimales obtenidas por el procedimiento de la presente invención. Específicamente, los productos de terapia celular pueden usarse para la formación de adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos, neurocitos y cardiomiocitos y la diferenciación en varias células según los entornos.

El término "producto de terapia celular", como se usa en el presente documento, se refiere a un medicamento para el tratamiento, diagnóstico y prevención que comprende células o tejidos preparados a partir de seres humanos mediante aislamiento, cultivo y manipulaciones especializadas (guía de la FDA de los Estados Unidos), Más particularmente a un fármaco para fines de tratamiento, diagnóstico y prevención, preparado por cualquier proceso que incluya la proliferación o clasificación in vitro de células autólogas, homólogas o heterólogas, o la modificación de las características biológicas de las células mediante otros procedimientos, a fin de restablecer la función de células o tejidos. Los productos de terapia celular se clasifican en gran parte en productos de terapia celular somática y productos de terapia con células madre de acuerdo con el grado de diferenciación celular, y la presente invención se dirige específicamente a un producto de terapia con células madre.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para producir células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas que tienen diversos orígenes genéticos. El sistema incluye: a) cultivar células madre pluripotentes humanas en un medio libre de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y seleccionar cuerpos embrionarios en el día 14 del cultivo; b) unir los cuerpos embrionarios a una placa de cultivo de tejidos y cultivar los cuerpos embrionarios utilizando el medio DMEM + FBS que induce así la diferenciación de los cuerpos embrionarios sin agregar citoquinas externas para inducir la diferenciación de los cuerpos embrionarios en células madre mesenquimales; c) y mantener y cultivar proliferativamente las células madre mesenquimales utilizando un medio que contenga el factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico humano básico (hFGF-B), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), hidrocortisona y ácido ascórbico.

Además, la presente invención describe un alimentador para el cultivo de células madre pluripotentes humanas. El alimentador es necesario para mantener continuamente un estado indiferenciado de las células madre pluripotentes humanas en su cultivo. El fibroblasto derivado de embrión de ratón se ha utilizado preferentemente como los

5 alimentadores existentes para las células madre pluripotentes humanas. Sin embargo, dado que la infiltración
 10 interespecifica de diversos patógenos se ha reconocido como un problema cuando las células madre pluripotentes
 se deben usar clínicamente, se ha informado que diversas células derivadas de humanos son posibles como
 15 alimentadores como una alternativa. Sin embargo, esto tampoco pudo superar las desventajas: la exclusión absoluta
 de patógenos heterólogos era imposible; los factores extraños para mantener el estado indiferenciado (por ejemplo,
 bFGF, IGF, y ACTIVIN, etc.) son esencialmente necesarios; y el suministro continuo de células para un cultivo largo
 es imposible. Por el contrario, las células madre mesenquimales derivadas de las células madre pluripotentes
 humanas, que se producen de acuerdo con la presente invención, pueden suministrar continuamente células con el
 mismo fondo, y también pueden excluir el rechazo inmunológico y/o la infiltración de otros patógenos como
 20 alimentadores autólogos. Además, los presentes inventores descubrieron que los factores de mantenimiento del
 estado no diferenciados extraños no son necesarios cuando las células madre mesenquimales derivadas de las
 células madre pluripotentes humanas, que se producen según la presente invención, se utilizan como alimentadores.
 En otras palabras, se confirmó que el estado indiferenciado se mantuvo incluso sin la adición de factores de
 mantenimiento de estado indiferenciados para 30 o más pases (véase la Figura 10), y este efecto notable, "que
 25 mantiene un estado indiferenciado durante mucho tiempo" no se pudo obtener incluso cuando los varios
 alimentadores existentes derivados de un ser humano se utilizan bajo la adición de una cantidad excesiva de
 factores para mantener el estado indiferenciado.

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos de referencia a
 30 continuación. Sin embargo, los siguientes ejemplos de referencia son simplemente para ejemplificar la presente
 invención.

[Ejemplos]

Ejemplo de referencia 1: Producción de células madre mesenquimales a partir de células madre embrionarias humanas del Hospital de la Universidad Nacional de Seúl

(1) Formación de cuerpos embrionarios.

35 Las células madre embrionarias humanas del Hospital de la Universidad Nacional de Seúl (#1 asiático, masculino,
 alimentador de STO), que se mantuvieron en un estado indiferenciado, se trataron con dispasa (2 mg/ml), seguidas
 de aislamiento a través de manipulación fina, y luego se cultivaron en un estado de suspensión en un medio de
 células madre embrionarias libre de bFGF durante 14 días.

El análisis génico se realizó en los cuerpos embrionarios el día 7 y el día 14 de cultivo, y se cuantificó una diferencia
 40 en la expresión génica asociada con la diferenciación mesenquimal para los cuerpos embrionarios respectivos
 utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se confirmó que la braquiuria y el BMPR, que son genes
 asociados con la diferenciación mesenquimal temprana, y Sox 17, que es un gen importante en las células
 mesenquimales cardíacas tempranas, se expresan notablemente en los cuerpos embrionarios en el día 14 de
 45 cultivo, en comparación con los cuerpos embrionarios en el día 7 del cultivo (véase, Figura 1B). Además, la
 expresión de la proteína braquiuria y la ubicación de la misma se confirmaron a través de la tinción de los cuerpos
 embrionarios en el día 14 de cultivo (véase la Figura 1C).

(2) Inducción de la diferenciación en células madre mesenquimales

Los cuerpos embrionarios preparados por cultivo en suspensión durante 14 días se unieron a una placa de cultivo de
 50 tejidos y luego se indujo la diferenciación natural en células madre mesenquimales. La clasificación de los cuerpos
 embrionarios en el día 14 en el momento del acoplamiento se muestra en la Figura 2A. Después del acoplamiento,
 algunos cuerpos embrionarios crecieron bien (una imagen izquierda de la Figura 2A), y otros cuerpos embrionarios
 no crecieron bien (una imagen derecha de la Figura 2A). Se observó la inducción de la diferenciación en células
 madre mesenquimales, mientras que los cuerpos embrionarios se cultivaron en un medio que comprende medio de
 55 Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) y suero bovino fetal (10% v/v) durante 16 días. Los resultados de la
 observación en el tercer día y el séptimo día después de la unión de los cuerpos embrionarios se muestran en la
 Figura 2B.

Como se ve en la Figura 2B, se confirmó que la inducción de la diferenciación espontánea de los cuerpos
 embrionarios en células madre mesenquimales se inició cuando los cuerpos embrionarios se cultivaron en un medio
 de cultivo general (DMEM+FBS) sin citoquina. Para descubrir el mecanismo de la inducción de la diferenciación, se
 60 comparó y observó el proceso de inducción de la diferenciación en las células madre mesenquimales a través del
 tratamiento con Noggin, que es un antagonista de BMP (véase Figuras 2C y 2D). Se confirmó que la diferenciación
 en las células madre mesenquimales se indujo en un grupo no tratado con Noggin (véase, Figura 2C), mientras que
 las células progenitoras mesenquimales no se observaron en un grupo tratado con Noggin (véase, Figura 2D). Se
 puede ver a partir de los resultados anteriores que, cuando los cuerpos embrionarios se cultivan en un medio de
 65 cultivo general sin adición externa de citoquinas, la inducción de la diferenciación espontánea en las células madre
 mesenquimales se debe a un sistema de bucle de retroalimentación automática BMP.

(3) Mantenimiento y cultivo proliferativo de células madre mesenquimales inducidas por diferenciación

Las células madre mesenquimales, que son inducidas por diferenciación mediante el cultivo de los cuerpos embrionarios durante 16 días después de la unión de las mismas en (2) del Ejemplo 1, se trataron con enzimas (tripsina-EDTA, tripsina al 0,25% con EDTA 4Na) y se separaron en células individuales, que luego se unieron de nuevo a una placa de cultivo de tejidos. Luego, las células se mantuvieron y se cultivaron proliferativamente a 37°C, usando 500 Ml de medio de cultivo que comprendía, 0,5 Ml de factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), 0,5 Ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), 2 Ml de fibroblasto humano factor de crecimiento básico (hFGF-B), 0,5 Ml de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), 0,2 Ml de hidrocortisona y 0,5 Ml de ácido ascórbico, más 470 M de un medio básico.

Con respecto a si la actividad de las células madre mesenquimales se mantuvo o no durante el cultivo proliferativo, las capacidades de mantenimiento de la actividad en el medio EGM-2MV utilizado en la presente invención y el medio α -MEM, que es el medio de cultivo de células madre mesenquimales existentes, se compararon entre sí a través de un experimento. Específicamente, la tinción beta-gal asociada a la senescencia se realizó en los grupos celulares cultivados utilizando los medios respectivos, y los resultados se muestran en la Figura 3 (el cultivo y la comparación se llevaron a cabo durante un mes, y se usaron las células del séptimo pasaje de cultivo).

Se muestra en la Figura 3 que la tinción beta-gal de más células se realizó en las células madre mesenquimales cultivadas utilizando el medio α -MEM que en las células madre mesenquimales cultivadas utilizando el medio EGM-2MV. Esto significa que, cuando las células madre mesenquimales se cultivan utilizando el medio α -MEM, la senescencia de las células madre mesenquimales se acelera y, por lo tanto, la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales se pierde, y finalmente, las células madre mesenquimales no pueden servir como productos de terapia celular. Considerando que, el uso del medio EGM-2MV de la presente invención puede mantener la actividad de las células madre mesenquimales durante un largo tiempo a pesar de los cultivos pasados sucesivos, y, por lo tanto, puede mejorar relativamente la puesta en práctica como los productos de terapia celular, en comparación con el uso del medio α -MEM.

Además, se examina si la identidad y la actividad de las células madre mesenquimales se pueden mantener o no continuamente cuando las células madre mesenquimales se cultivan durante un largo tiempo utilizando el medio EGM-2MV, y los resultados de las mismas se muestran en la Figura 4. La Figura 4A muestra células después de un cultivo de 140 días o más utilizando el medio EGM-2MV, y muestra que la forma de crecimiento de las células aún tiene un patrón de huella dactilar, que es un patrón típico de las células madre mesenquimales. La Figura 4B muestra que la división celular ocurre de manera continua y vigorosa hasta 140 días de cultivo, y se muestra que la actividad de las células madre mesenquimales puede mantenerse continuamente. En conclusión, se puede ver claramente que la identidad y la actividad de las células madre mesenquimales se pueden mantener durante mucho tiempo cuando las células madre mesenquimales inducidas por diferenciación se mantienen y se cultivan proliferativamente en el medio EGM-2MV de la presente invención.

Ejemplo de referencia 2: Caracterización de células madre mesenquimales

(1) Análisis de marcadores de superficie celular.

Se analizó si los marcadores de superficie celular específicos para las células madre mesenquimales obtenidas en el Ejemplo 1 se expresan o no. Los resultados que se obtienen utilizando un clasificador de células activadas por fluorescencia después de la reacción antígeno-anticuerpo se muestran en la Figura 5. Se utilizó IgG como control.

Se confirmó a partir de la Figura 5A, que CD73 y CD105, que son marcadores específicos de las células madre mesenquimales, se expresaron todavía en gran cantidad, en las células en el día 95 del cultivo (D95) y en el día 129 del cultivo (D129). Además, el análisis del marcador de la superficie celular se realizó en las células madre mesenquimales en el día 129 del cultivo, y los resultados se muestran en la Figura 5B. Se confirmó a partir de la Figura 5B, que CD29, CD44 y CD90, que son marcadores de células madre mesenquimales humanas (hMSC), se expresaron, pero no se expresaron ni SSEA1, SSEA4, TRA-1-60 y OCT-4, que son células madre embrionarias humanas (hESC), ni los marcadores, ni marcadores de endodermo y ectodermo (otros marcadores de linaje).

Finalmente, según el procedimiento de la presente invención, se muestra claramente que la diferenciación de solo las células madre mesenquimales se induce selectivamente a partir de células madre pluripotentes humanas, y, además, la identidad de las células madre mesenquimales todavía se puede mantener en el tiempo de un largo cultivo proliferativo de las células.

(2) Análisis de cariotipo

El cariotipo de las células madre mesenquimales (en el día 160 de cultivo) obtenido en el Ejemplo 1 se analizó utilizando un procedimiento de bandas G (Saccone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4913-4917, 1992), y los resultados se muestran en la Figura 6. Se confirmó a partir de la Figura 6, que la célula madre mesenquimal tenía un cariotipo normal de XY+44.

(3) Confirmación de la función (capacidad de diferenciación) de las células madre mesenquimales.

Para confirmar la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales (en 129 días de cultivo) obtenida en el Ejemplo 1, el análisis se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito anteriormente (Tiziano Barberi et al., PLoS Medicine, 2: 0554-0560, junio de 2005 y Kitsie J. Penick et al., Biotechniques, 39: 687-691, 2005). Específicamente, se indujo la diferenciación en adipocitos, condrocitos, osteocitos y miocitos de las células madre mesenquimales, y luego se examinó la expresión génica específica de las células respectivas mediante una reacción de inmunotinción. Los resultados de la diferenciación celular se muestran en la Figura 7A.

Los adipocitos se tiñeron con Oil Red O, que tiñe gotitas de adipocitos, y los condrocitos se tiñeron con agregano y colágeno II, que son proteínas de expresión específica para los mismos, mediante el uso de una reacción antígeno-anticuerpo. Además, la diferenciación de los osteocitos se confirmó mediante la tinción de Von Kossa que puede confirmar la formación de minerales, y la diferenciación de los miocitos se confirmó mediante MYF 5, que es una proteína de expresión específica, utilizando una reacción antígeno-anticuerpo.

Además, las expresiones de los genes respectivos específicos de los adipocitos, condrocitos, osteocitos y miocitos se cuantificaron por PCR cuando las células madre mesenquimales se diferenciaron en las células respectivas, y los resultados se muestran en la Figura 7B. Se confirmó a partir de la Figura 7B, que se expresaron Serbf y PPARy en los adipocitos, ALP, osteocalcina y osteopontina en los osteocitos, agregano en los condrocitos y MyoD en los miocitos, respectivamente. Se muestra claramente a partir de los resultados anteriores, que las células madre mesenquimales obtenidas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención retienen la pluripotencia para diferenciarse en adipocitos, condrocitos, osteocitos y miocitos.

(4) Confirmación de la tumorigénesis utilizando ratones inmunodeficientes

Se confirmó si las células madre mesenquimales de la presente invención obtenidas mediante el uso de ratones inmunodeficientes en el Ejemplo 1 eran tumorigénicas o no. Se usaron células madre embrionarias humanas para un experimento de control. Específicamente, se inyectaron 1×10^7 de las células madre mesenquimales y 3×10^6 de células madre embrionarias humanas del Hospital de la Universidad Nacional de Seúl en los ratones inmunodeficientes, y los resultados de la autopsia después de 12 semanas se muestran en la Figura 8A. Se confirmó a partir de la Figura 8A, que se generó teratoma en los ratones en los que se inyectaron células madre embrionarias humanas del Hospital de la Universidad Nacional de Seúl, y el teratoma no se generó en los ratones en los que se inyectaron las células madre mesenquimales de la presente invención. Además, FACS confirmó que los factores asociados con la inducción inmune no se expresaron, y los resultados se muestran en la Figura 8B. La IgG, se utilizó como control. Se confirmó a partir de la Figura 8B, que HLA-DR y HLA-DQ, que son moléculas MHC II expresadas debido a la presencia de inmunogenicidad, no se expresaron como factores de superficie, y B7-2 y B7-1, que son cosimuladores asociados con la inducción inmune, no fueron expresados.

En conclusión, se confirmó que los tumores no se inducían incluso cuando las células madre mesenquimales de la presente invención se trasplantaban a los ratones en una cantidad de aproximadamente tres o más veces el número de células madre embrionarias, el control y los factores asociados con el sistema inmunitario. La inducción no se expresó ni siquiera durante un largo cultivo de 12 semanas. Por lo tanto, se muestra claramente que las células madre mesenquimales de la presente invención están libres del riesgo de tumorigénesis.

(5) Evaluación de la funcionalidad utilizando un modelo de enfermedad cardiovascular isquémica.

Con el fin de estimar la funcionalidad de las células madre mesenquimales de la presente invención obtenidas del Ejemplo 1 con respecto a la enfermedad cardiovascular isquémica, se usó un modelo de ratón con enfermedad cardiovascular isquémica. Después de que se trasplantaron 5×10^4 células madre mesenquimales (en 129 días de cultivo) por ratón a los ratones que tenían la enfermedad anterior, se estimó la funcionalidad de las células madre mesenquimales durante 8 semanas y los resultados se muestran en la Figura 9.

Las Figuras 9A y 9B muestran un corazón en el que se trasplantaron las células madre mesenquimales y un corazón en el que no se trasplantaron las células madre mesenquimales. La fibrosis se visualizó mediante tinción con MT y una porción azul en el dibujo indica fibrosis. Se muestra en las Figuras 9A y 9B, ese adelgazamiento debido a la fibrosis de las paredes cardíacas fue menor en un tejido cardíaco en el que se trasplantaron las células (Figura 9A) que en un tejido cardíaco en el que no se trasplantaron las células (Figura 9B). Es decir, la fibrosis de las paredes cardíacas se produce en la enfermedad cardíaca isquémica y, por lo tanto, las paredes se adelgazan. Entre tanto, cuando las células madre mesenquimales de la presente invención fueron trasplantadas, se puede prevenir el adelgazamiento de las paredes cardíacas debido a la fibrosis. Además, la Figura 9C muestra los resultados de que la porción de fibrosis de la pared cardíaca en el área de lesión inducida se expresó y cuantificó numéricamente, y se muestra claramente que la porción de fibrosis se reduce aún más en un grupo de trasplante celular que en el control sin trasplante celular. La Figura 9D muestra los resultados de la medición del electrocardiograma de eco en el seguimiento de 8 semanas. Dos registros de medición de electrocardiogramas en la cuarta y la octava semana pueden confirmar que el movimiento de la pared cardíaca fue mejor en el grupo de trasplante celular que en el control. LVEDD representa diástole y LVFS representa sístole, y como el valor de LVEDD es menor y el valor de LVFS es mayor, la función cardíaca es mejor.

Se confirmó a partir de los resultados, que cuando las células madre mesenquimales de la presente invención se trasplantaron en el modelo de enfermedad cardiovascular isquémica, la pared cardíaca no se adelgaza y las células madre mesenquimales sustituyen a los tejidos muertos y, por lo tanto, el área de fibrosis se reduce el mal funcionamiento cardíaco, lo que finalmente mejora la enfermedad cardiovascular isquémica.

5 (6) Experimentos de funcionalidad como alimentadores autólogos

Se investigó la posibilidad de que las células madre mesenquimales de la presente invención obtenidas en el Ejemplo 1 sean utilizables como alimentadores para mantener las células madre pluripotentes humanas en un estado indiferenciado. En el presente experimento, el cultivo se realizó sin bFGF, que es un factor de mantenimiento del estado no diferenciado de las células madre pluripotentes humanas.

10 Específicamente, la línea de células madre embrionarias humanas No. 3 del Hospital de la Universidad Nacional de Seúl (SNUhES3) se cultivó utilizando células madre mesenquimales (SNU3MSC-1) de acuerdo con la presente invención obtenida al inducir la diferenciación de la línea de células madre embrionarias humanas No. 3 en el Hospital Universitario Nacional de Seúl (SNUhES3) como alimentadores. Se confirmó que, cuando las células madre embrionarias humanas se cultivaron sin el factor de mantenimiento del estado indiferenciado, bFGF, el estado no diferenciado de las células madre embrionarias humanas se mantuvo a pesar de 30 o más cultivos pasados (véase, Figura 10). Se puede observar en la Figura 10 que OCT-4, SSEA-4 y TRA-1-60, que son los marcadores de células madre pluripotentes humanas, se expresaron incluso después de 30 cultivos pasados, y esto demuestra que la capacidad de indiferenciación de los mismos se mantiene intacta. En conclusión, se confirmó que, cuando las células madre mesenquimales de la presente invención se utilizan como alimentadores autólogos en el momento del cultivo de las células madre pluripotentes humanas, la capacidad de indiferenciación de las células madre pluripotentes se puede mantener continuamente incluso sin la adición de bFGF, que era necesario para mantener la capacidad de indiferenciación de las células madre pluripotentes durante el cultivo existente de las mismas.

25 **Ejemplo de referencia 3: Producción de células madre mesenquimales a partir de células madre embrionarias humanas de Cha Medical Center y células madre embrionarias humanas H9 y su caracterización**

Se llevaron a cabo experimentos para confirmar si el procedimiento de producción de las células madre mesenquimales de la presente invención se puede aplicar o no a las células madre pluripotentes humanas que tienen diferentes antecedentes genéticos y/o entornos de cultivo, es decir, su reproducibilidad. El experimento se realizó mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 de la presente invención, excepto que se utilizaron la línea de células madre embrionarias humanas No. 3 del Centro Médico Cha (CHA3-hESC) y células madre embrionarias humanas H9, que tienen diferentes antecedentes genéticos y/o entornos de cultivo de células madre embrionarias humanas del Hospital de la Universidad Nacional de Seúl. Específicamente, después de la unión de los cuerpos embrionarios en el día 14 del cultivo, se induce la diferenciación espontánea en las células madre mesenquimales en un medio de cultivo general sin adición externa de citoquinas, y luego, las células madre mesenquimales se obtuvieron a través de un cultivo de mantenimiento y proliferativo usando el medio EGM-2MV.

La Figura 11 muestra los resultados de la verificación de la reproducibilidad en el procedimiento de producción de las células madre mesenquimales de la presente invención utilizando la línea de células madre embrionarias humanas No. 3 del Centro Médico Cha (CHA3-hESC) y las células madre embrionarias H9 humanas, que tienen diferentes antecedentes genéticos y/o entornos de cultivo a partir de células madre embrionarias humanas del Hospital de la Universidad Nacional de Seúl.

Como se puede ver en la Figura 11A y la Figura 11B, tanto las células madre mesenquimales derivadas del Centro Médico Cha (en el día 90 del cultivo) como las células madre mesenquimales derivadas de las células H9 (en el día 90 del cultivo) mostraron fenotipos típicos de las células madre mesenquimales. Además, los resultados del análisis de la expresión de proteínas mediante el uso de un clasificador de células activadas por fluorescencia confirmaron que CD105, CD73, CD29, CD44 y CD90, que son proteínas específicas de las células madre mesenquimales, fueron reconocidos como positivos, y SSEA-1, SSEA-4, y TRA-1-60, que son marcadores específicos para las células madre embrionarias, y CD45, CD34, que son marcadores derivados de otras capas germinales, fueron reconocidos como negativos [véase, Figura 11C (D90, células madre mesenquimales derivadas de células del Centro Médico Cha y Figura 11 (D90, células madre mesenquimales derivadas de células H9)].

Además, como resultado de los análisis de los cariotipos de las células madre mesenquimales derivadas de las células del Centro Médico Cha (en el día 90 del cultivo) y las células madre mesenquimales derivadas de las células H9 (en el día 90 del cultivo) mediante el uso de un procedimiento de bandas G (Saccone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4913-4917, 1992), se confirmó que ambos tenían un cariotipo normal de XY+44 (véase, Figura 11E y Figura 11F, respectivamente).

55 A partir de los resultados anteriores, se demostró que el procedimiento para producir células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas de acuerdo con la presente invención es un procedimiento estandarizado para cultivar células madre mesenquimales, que puede aplicarse en general a células madre pluripotentes humanas que tienen diferentes antecedentes genéticos y/o ambientes de cultivo.

5 La presente invención proporciona un procedimiento estandarizado para inducir la diferenciación y el cultivo
proliferativo de células madre mesenquimales, que puede aplicarse ampliamente a todas las células madre
pluripotentes humanas independientemente de una diferencia en el antecedente genético de las mismas. Además, la
presente invención puede producir de forma continua las células madre mesenquimales, como los mejores recursos
para los productos de terapia celular, mientras se mantiene la identidad de las células madre mesenquimales.
Además, la presente invención puede superar el riesgo de xenopatógenos debido a la inducción de
10 xenoalimentadores y el daño celular que puede resultar de una clasificación por un clasificador de células activadas
por fluorescencia (FACS), y permitir una producción de alta eficiencia de las células madre mesenquimales a costes
bajos. En última instancia, la presente invención puede producir en masa fácilmente las células madre
mesenquimales, que son idealmente utilizables en medicina regenerativa y terapia celular, utilizando células madre
pluripotentes humanas, realizando así usos prácticos de productos de terapia celular. Además, se espera que la
presente invención contribuya altamente a los tratamientos de enfermedades incurables, tales como enfermedades
cardiovasculares y trastornos neurológicos.

15 De acuerdo con la presente invención, las células madre mesenquimales pueden producirse en masa como los
mejores recursos para los productos de terapia celular a bajo coste, mientras se mantiene la identidad de los
mismos. En última instancia, la presente invención puede producir en masa fácilmente las células madre
mesenquimales, que pueden usarse idealmente en medicina generativa y terapia celular, utilizando células madre
pluripotentes humanas, realizando así usos prácticos de agentes de tratamiento celular. Además, la presente
20 invención puede contribuir altamente a los tratamientos de enfermedades incurables, tales como enfermedades
cardiovasculares y trastornos neurológicos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de células madre mesenquimales a partir de células madre pluripotentes humanas, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 a) cultivar células madre pluripotentes humanas en un estado de suspensión en un medio libre de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) durante 14 días para formar cuerpos embrionarios;
 - b) unir los cuerpos embrionarios de la etapa a) a una placa de cultivo y cultivar los cuerpos embrionarios en componentes básicos del Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene suero fetal bovino (FBS) sin agregar citoquinas externas para inducir la diferenciación de los cuerpos embrionarios y en células madre mesenquimales; y
 - 10 c) cultivar proliferativamente las células madre mesenquimales mientras se mantiene la identidad de las células madre mesenquimales.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la citoquina es una proteína morfogénica ósea (BMP) o un factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células madre mesenquimales de la etapa c) se cultivan utilizando un medio que contiene factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos humano básico (hFGF-B), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), hidrocortisona y ácido ascórbico.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células madre mesenquimales de la etapa c) pueden diferenciarse en células seleccionadas del grupo que consiste en adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos, neurocitos y cardiomiocitos.
- 20

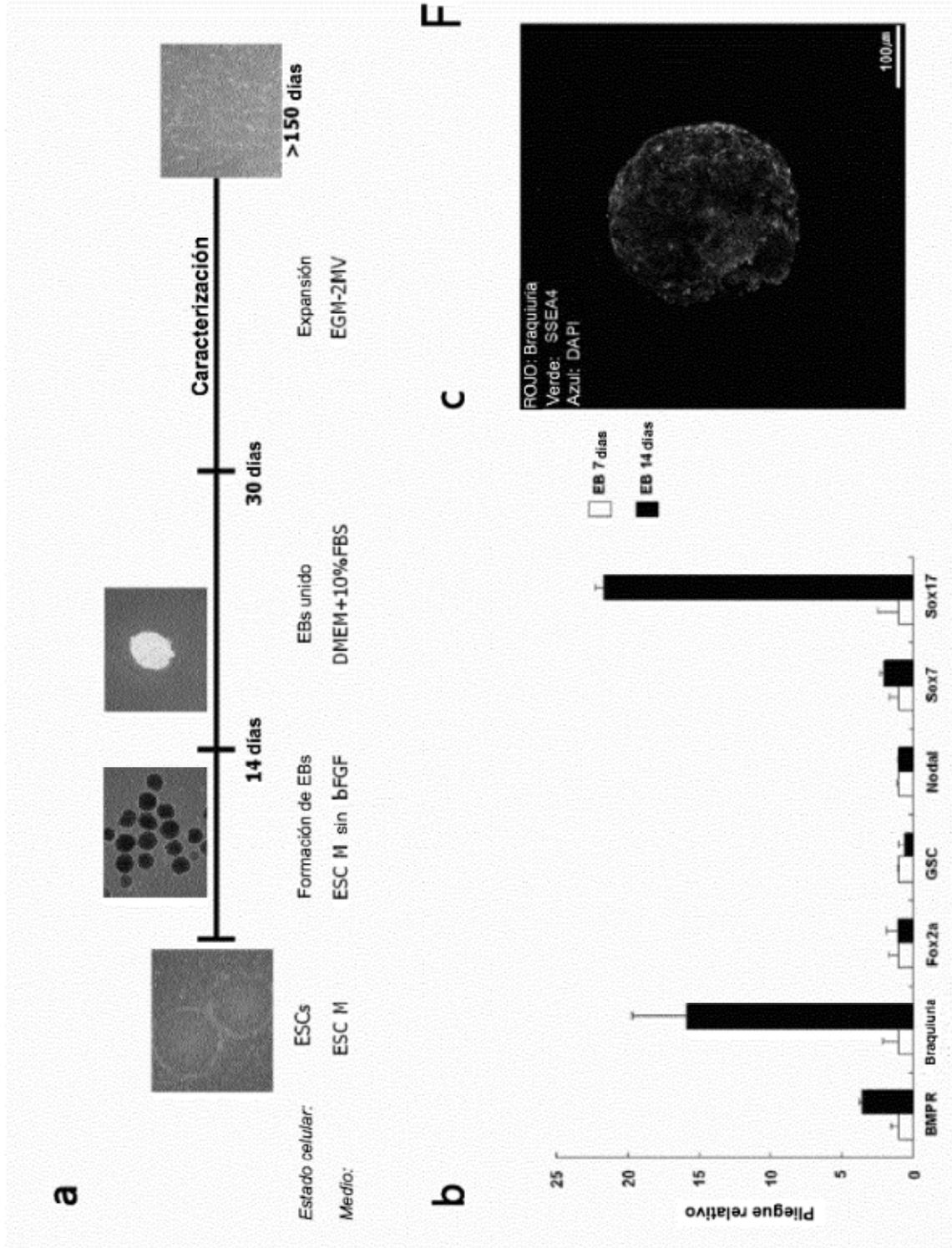
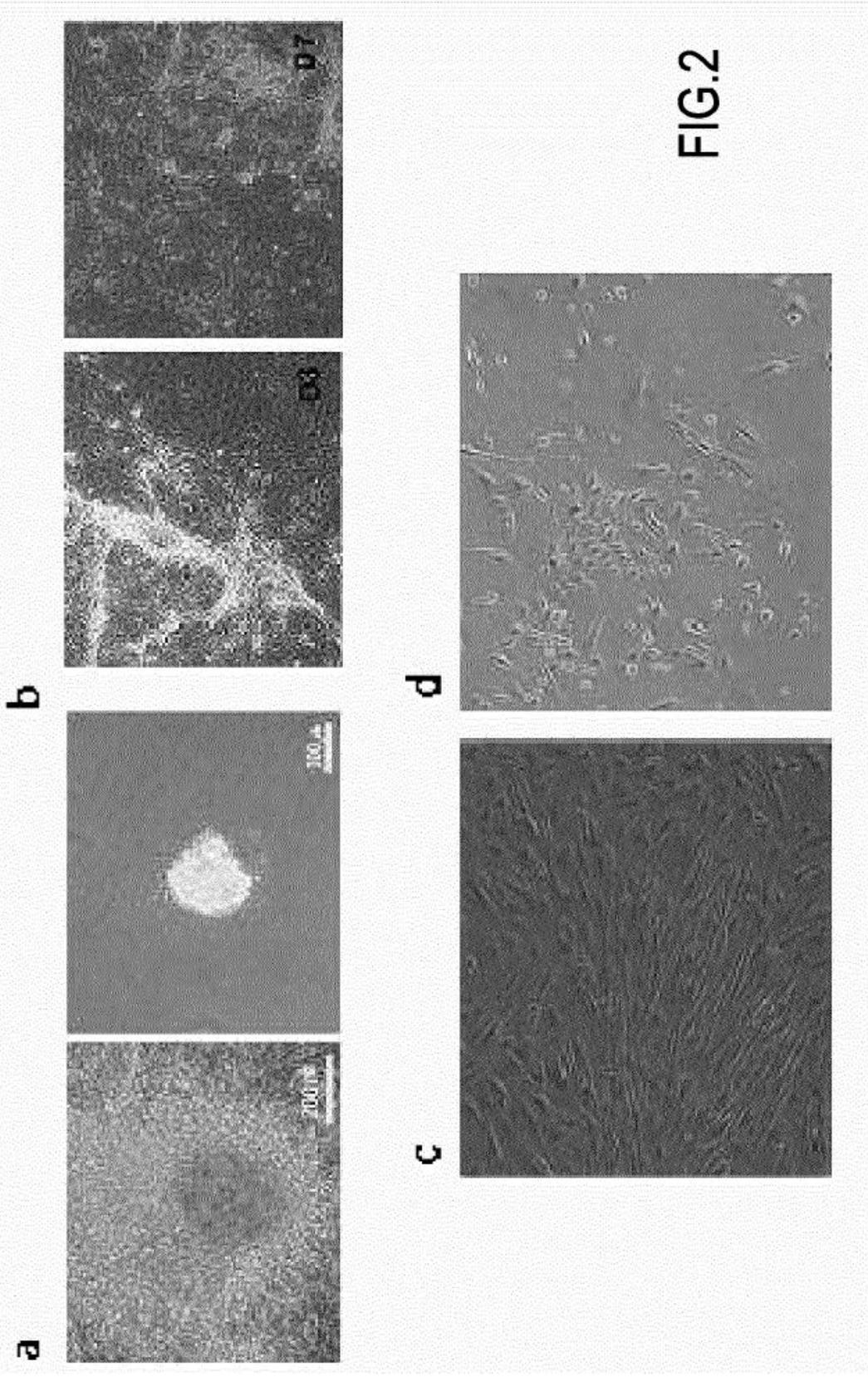


FIG.1



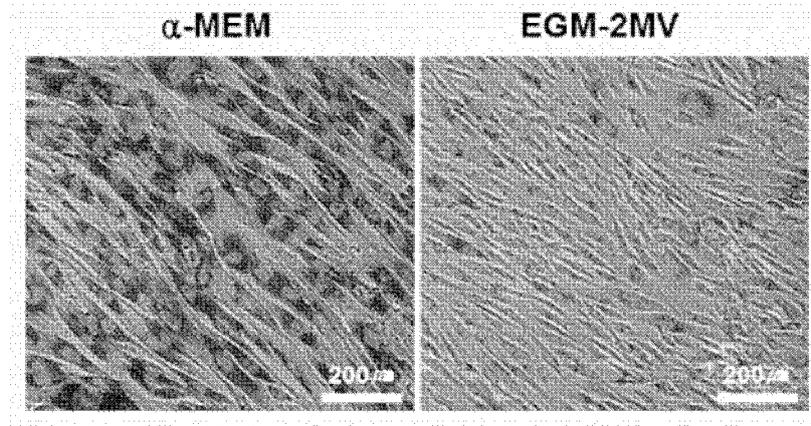


FIG.3

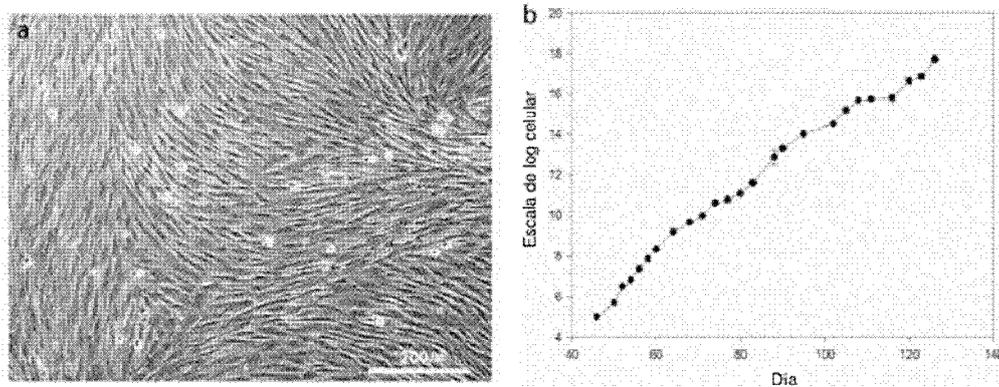


FIG.4

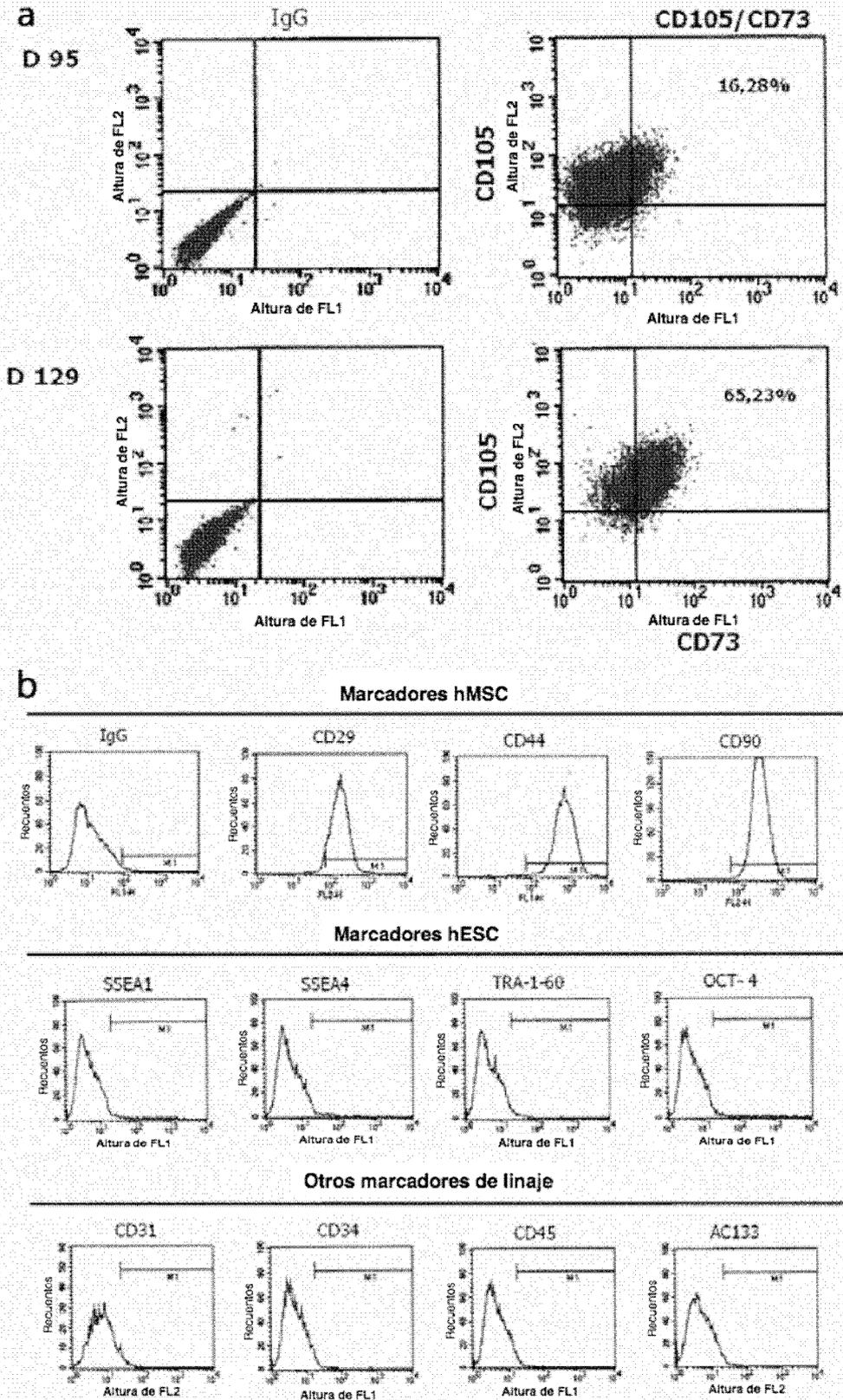


FIG.5

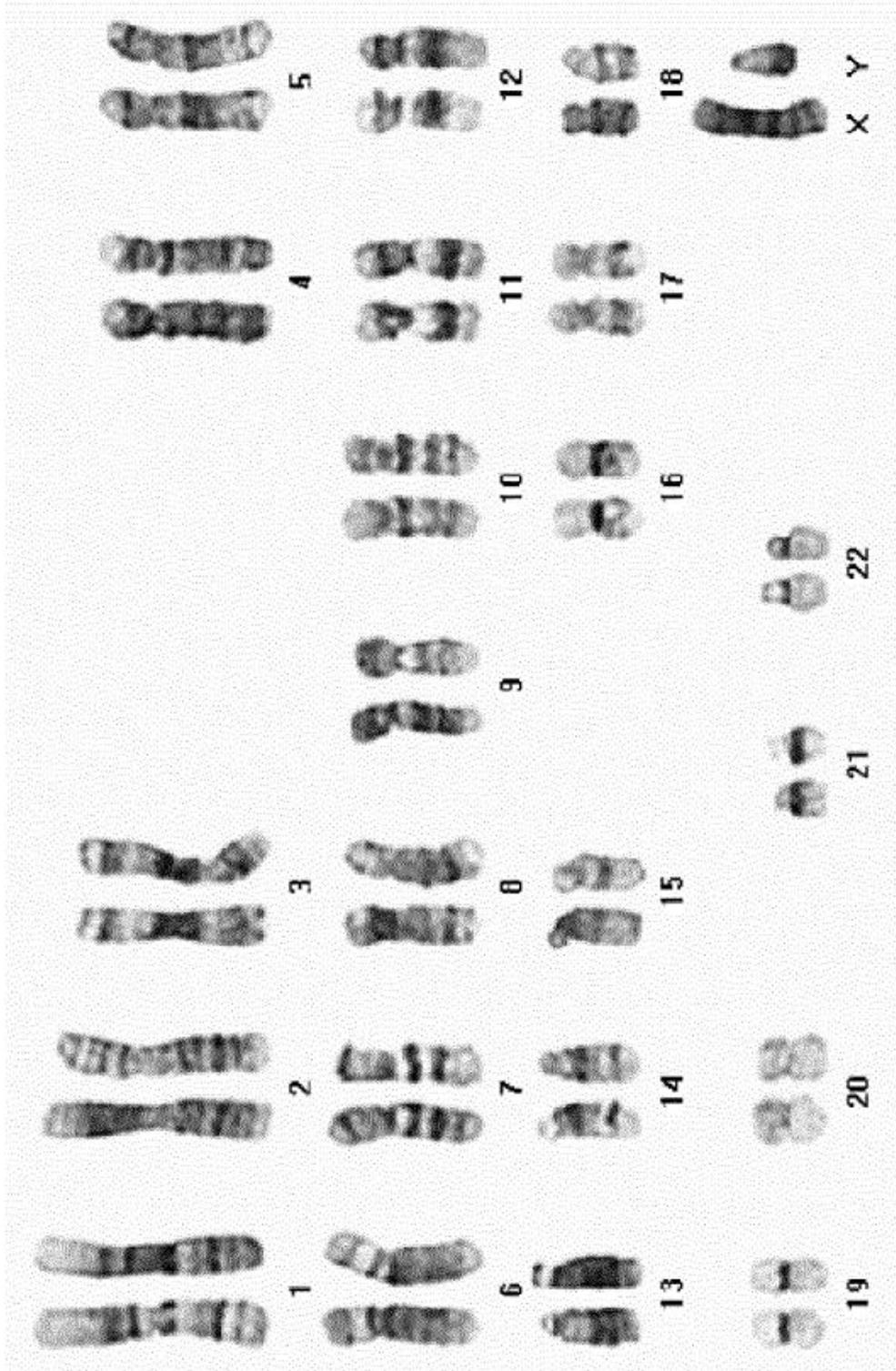


FIG.6

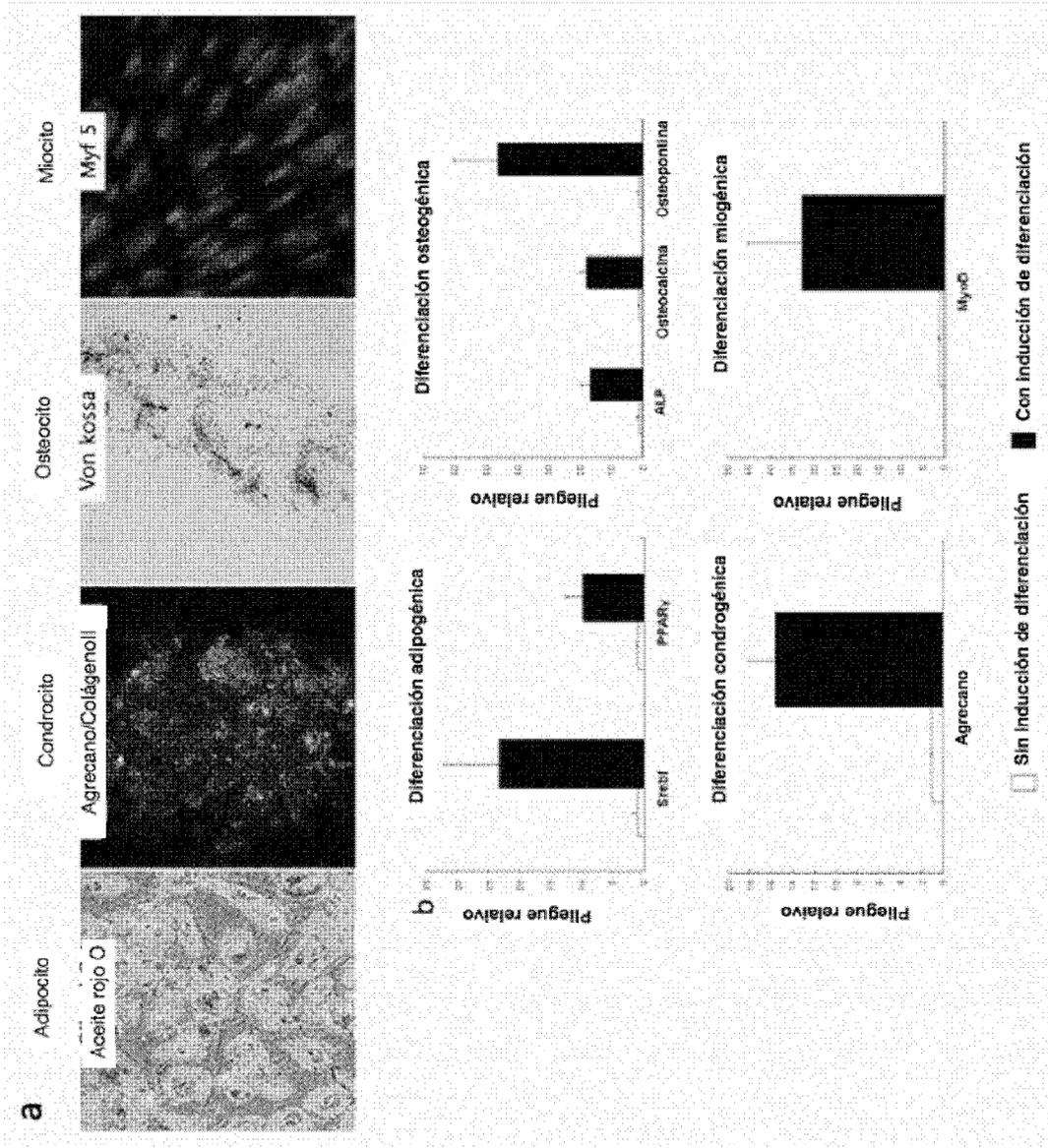
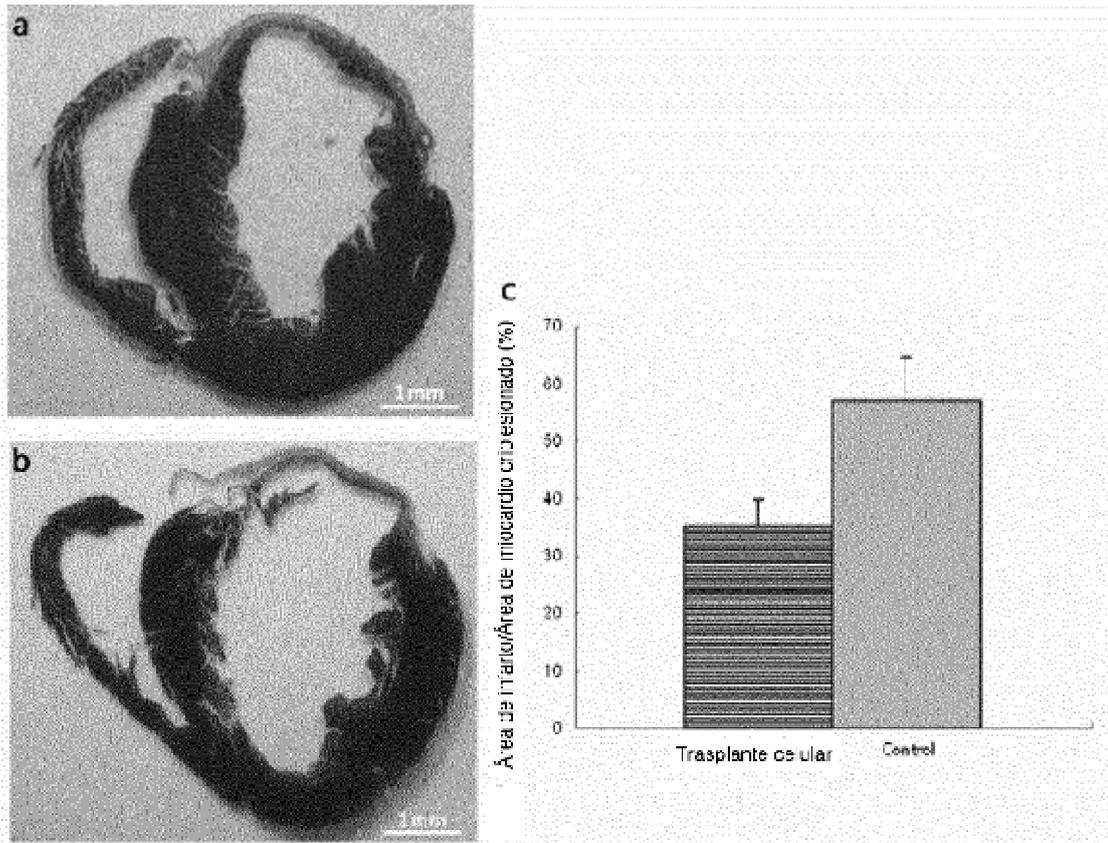


FIG.7



d Variables ecocardiográficas en modelo de infarto de ratones.

	Línea base		4 semanas		8 semanas	
	LVEDD (mm)	LVFS (%)	LVEDD (mm)	LVFS (%)	LVEDD (mm)	LVFS (%)
Control	39,1±3,8	22,1±0,2	41,6±3,7	20,3±2,9	42,6±4,7	20,5±1,0
Célula trasplante	38,0±0,9	22,8±0,4	40,0±1,5	25,0±2,2	41,1±2,5	23,7±3,7

*LVEDD: dimensión diastólica final del ventrículo izquierdo, *LVFS: acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo

FIG.9

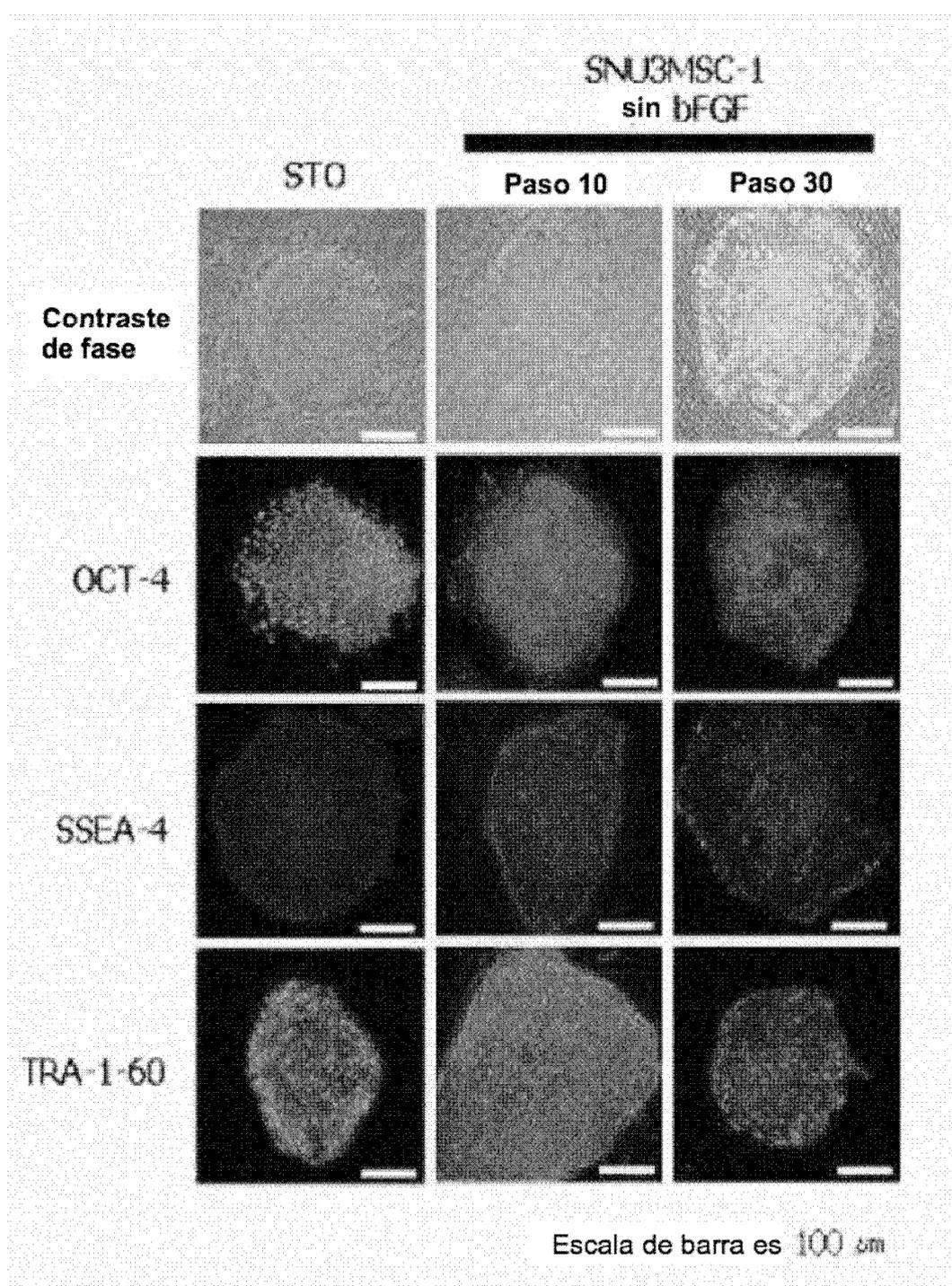


FIG.10

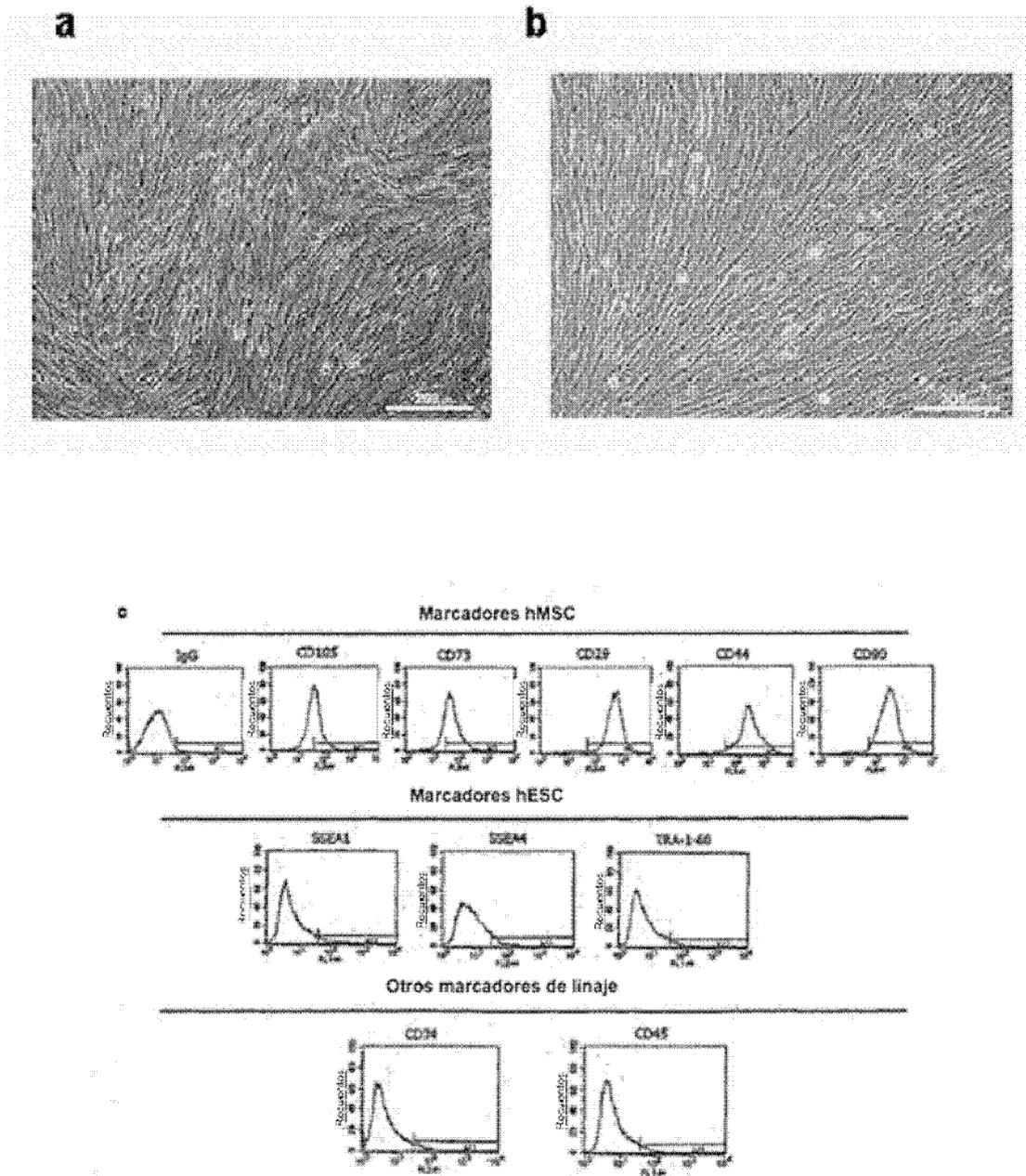


FIG.11

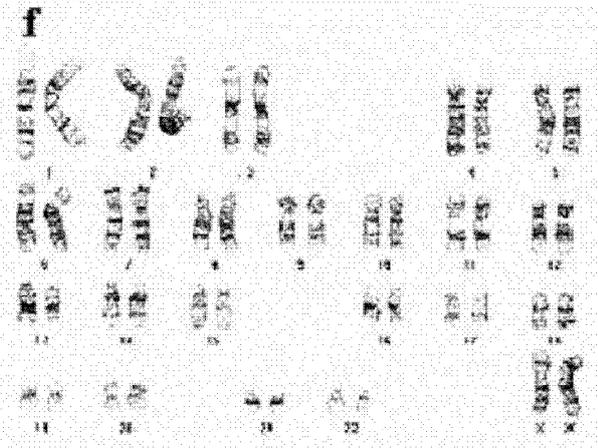
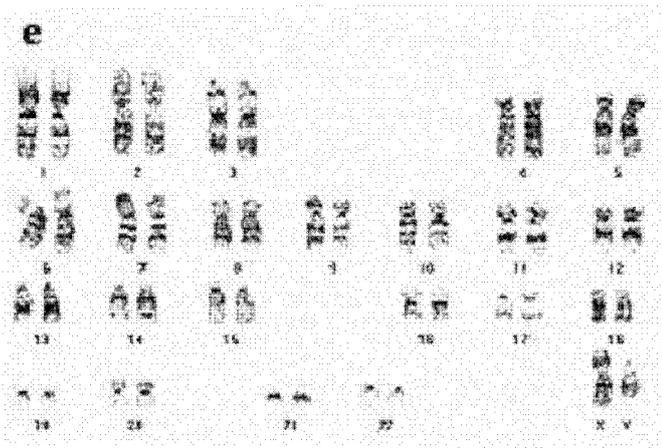
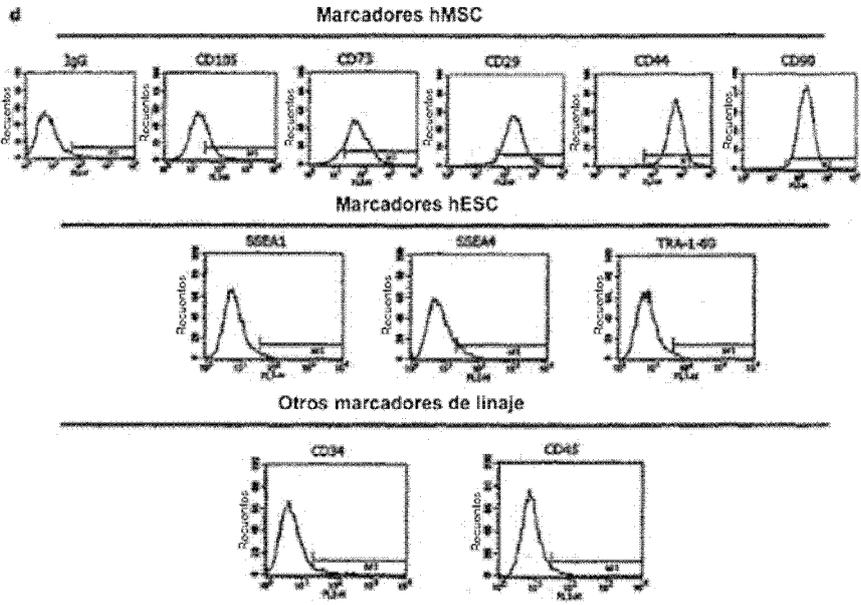


FIG.11