(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 755 802**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/28 (2015.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2013 PCT/KR2013/007891**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14035215**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2013 E 13833872 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2893001**

(54) Título: **Método para el cultivo de células madre mesenquimatosas**

(30) Prioridad:

03.09.2012 KR 20120097193

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2020

(73) Titular/es:

MEDIPOST CO., LTD. (100.0%)
No. 18, Seocho-daero 50-gil, Seocho-gu
Seoul 137-874 , KR

(72) Inventor/es:

YANG, YOON-SUN;
OH, WON IL;
KWON, SUN JAE;
LEE, MI YEON y
JEON, HONG BAE

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

DESCRIPCIÓN

Método para el cultivo de células madre mesenquimatosas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para el cultivo de células madre mesenquimatosas con eficacia.

Antecedentes de la invención

La expresión "célula madre" es un nombre genérico para un tipo indiferenciado de célula del cuerpo que se encuentra en tejidos de embriones, fetos y adultos, que tiene el potencial de diferenciarse en una amplia gama de tipos de células especializadas. Las células madre se caracterizan por la autorrenovación, la capacidad de pasar por numerosos ciclos de división celular (mientras mantienen un estado indiferenciado) y potencia, la capacidad para diferenciarse en tipos de células especializadas en respuesta a ciertos estímulos (ambiente) e incluso por la plasticidad, la capacidad de cruzar barreras de linaje y de adoptar el perfil de expresión y los fenotipos funcionales de células que son únicas de otros tejidos.

Las células madre pueden clasificarse según varios criterios. La potencia permite la clasificación de las células madre en: células madre pluripotentes, células madre multipotentes y células madre unipotentes. Las células madre pluripotentes tienen pluripotencia para diferenciarse en cualquier tipo de células. Las células madre embrionarias y las células madre pluripotentes inducidas (iPS), que recientemente han recibido una atención especial por parte de los científicos, son representativas de células madre pluripotentes. Las células madre de adulto muestran multipotencia o unipotencia. Entre ellas están las células madre hematopoyéticas, las células madre mesenquimatosas, las células madre neuronales, etc.

A pesar de varios intentos para utilizar la pluripotencia de células madre embrionarias en terapias celulares, todavía se mantienen la elevada probabilidad de oncogénesis y de respuesta de rechazo inmunológico y constituyen obstáculos difíciles de superar.

Recientemente se han sugerido las células madre pluripotentes inducidas (células iPS) como solución a estos problemas. Las células iPS son un tipo de célula madre pluripotente derivada artificialmente de una célula somática adulta diferenciada por reprogramación. Las células iPS pueden evitar la cuestión de la respuesta de rechazo inmunológico porque derivan enteramente del paciente, sin embargo, el riesgo de oncogénesis con células iPS es todavía un problema a resolver.

Como alternativa, se están promocionando las células madre mesenquimatosas porque presentan efectos inmunomoduladores y no presentan riesgo de oncogénesis. Las células madre mesenquimatosas son células madre multipotentes que pueden diferenciarse en una variedad de tipos celulares, incluyendo adipocitos, osteoblastos, condrocitos, mioblastos, neuroblastos, miocardioblastos, hepatocitos, células beta de islote, células vasculares, etc. y se sabe que tienen la función de modular respuestas inmunitarias.

Las células madre mesenquimatosas pueden aislarse de varios tejidos tales como la médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, etc., pero no están suficientemente definidas porque los marcadores de superficie son algo diferentes uno de otro según el origen del cual deriven las células madre mesenquimatosas. En su conjunto, si se pueden diferenciar en osteoblastos, condrocitos y mioblastos, tienen una morfología en forma de huso y expresan los marcadores de superficie CD73(+), CD105(+), CD34(-) y CD45(-), las células madre se definen como células madre mesenquimatosas. En este contexto, las células madre mesenquimatosas de diferentes orígenes genéticos y/o antecedentes básicamente no difieren unas de otras en términos de su definición, es decir, la de una célula madre mesenquimatosa, pero son típicamente diferentes unas de otras en términos de actividad *in vivo*. Adicionalmente, cuando las células madre mesenquimatosas se utilizan como células exógenas terapéuticas, un conjunto limitado de células madre mesenquimatosas no permite muchas posibilidades u opciones disponibles, incluso a pesar de la baja actividad *in vivo*.

Además, el número mínimo necesario de células madre mesenquimatosas para que sean utilizadas como un agente terapéutico celular en medicina regenerativa y/o terapia celular es de aproximadamente 1×10^9 células. En la práctica, el número mínimo se incrementa adicionalmente si se tienen en cuenta los experimentos para establecer condiciones adecuadas y determinar criterios. El suministro de células madre mesenquimatosas en tales cantidades de varios orígenes requiere de al menos diez pases *in vitro*. En este caso, sin embargo, las células envejecen y se deforman de manera que pueden ser inadecuadas para el uso como agentes terapéuticos celulares.

Por tanto, se requiere un método de cultivo efectivo para la producción en masa de células madre mesenquimatosas.

Se describen métodos para el cultivo de células madre mesenquimatosas en la publicación de patente abierta coreana n.º 2003-0069115 y en la bibliografía [Pittinger MF et al. Science, 284: 143-7, 1999; Lazarus HM et al. Bone Marrow Transplant, 16: 557-64, 1995; y Kern et al., Stem Cells, 24: 1294-1301, 2006], pero se encontraron dificultades para

garantizar el número de células disponibles para producción en masa. Además, estos métodos sufren la desventaja de un número decreciente de células madre mesenquimatosas en la capacidad de proliferación cada pase. Por ejemplo, las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical no pueden proliferar, pero envejecen rápidamente después de 9~10 pases y este fenómeno ocurre después de 5~6 pases en células madre mesenquimatosas de médula ósea o derivadas de lípidos. Por tanto, se necesita un nuevo método por el que el número de células madre mesenquimatosas pueda incrementarse en la suficiente magnitud para aplicación industrial con mayor simplicidad y beneficio económico comparado con métodos convencionales.

El documento WO2010/150094 desvela el cultivo de células madre mesenquimatosas en condiciones de hipoxia.

Xu et al., Mol. Biol. Rep. (2012) 39: 7271-7279, desvelan que la exposición al calcio aumenta la proliferación células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

Sumario de la invención

Uno de los objetivos de la presente invención es, por tanto, proporcionar un método para el cultivo de células madre mesenquimatosas con eficacia.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para el cultivo de células madre mesenquimatosas, que comprende el cultivo de células madre mesenquimatosas en un medio que contiene calcio en una concentración de 3,3 a 3,8 mM y magnesio en una concentración de 1,0 a 3,0 mM en una condición de hipoxia con una concentración de oxígeno del 2 al 5 %.

El método de cultivo de la presente invención puede aumentar la población de células madre mesenquimatosas incluso en un número de pases pequeño mejorando las células madre mesenquimatosas en capacidad proliferativa y viabilidad. Además, las células madre mesenquimatosas preparadas mediante el método de cultivo de la presente invención se emplean eficazmente no solo como un agente terapéutico celular seguro debido a su falta de inmunogenicidad, sino también como una medicina regenerativa de cartílago debido a su excelente secreción de citocinas.

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A y 1B son gráficos que muestran el recuento celular, en veces, con respecto al recuento de células sembradas 7 días (arriba) y los recuentos celulares acumulados hasta 21 días (abajo) después de cultivar células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de dos fuentes diferentes (MSC n.º 1 y n.º 2) en α-MEM con un intervalo de concentración de calcio de 1,8 a 9,3 mM. En los gráficos superiores, P1 a P3 representan el número de pases.

Las Figs. 2A y 2B son gráficos que muestran recuentos celulares después de cultivar células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de dos fuentes diferentes (MSC n.º 1 y n.º 2) durante 7 días en presencia de una concentración total de calcio de 1,8 a 3,6 mM (arriba) y durante 6 días en presencia de una concentración total de calcio de 1,8 mM a 4,4 mM (abajo).

Las Figs. 3A y 3B son gráficos que muestran tiempos de duplicación cuando se cultivaron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de dos fuentes diferentes (MSC n.º 1 y n.º 2) en varias condiciones de oxígeno (normal, 3 % y 5 %) (arriba) y recuentos celulares acumulados hasta 21 días después de cultivar células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en las condiciones de oxígeno (abajo). En los gráficos superiores, P1 a P3 representan el número de pases. La Fig. 4 muestra tiempos de duplicación (arriba) y recuentos celulares acumulados (abajo) después del cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical (MSC n.º 1) en una condición típica (control), en una condición de incremento de calcio (Ca^{2+}), en una condición de hipoxia y en una condición de CMH. En cada gráfico, P5 a P12 representan números de pases y la condición de CMH representa una combinación de la condición de adición de calcio y magnesio y la condición de hipoxia. La Fig. 5 muestra la viabilidad celular (gráfico superior) y las tasas de recuperación (gráfico inferior) 1 y 2 días después del cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en una condición típica (control), en una condición de adición de calcio (Ca^{2+}), en una condición de hipoxia y en una condición de CMH.

Las Figs. 6A y 6B muestran tiempos de duplicación (arriba) y recuentos celulares acumulados (abajo) después del cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical (MSC n.º 1 a n.º 4) en una condición típica (control) y en una condición de CMH. En cada gráfico, P1 a P9 representan el número de pases.

La Fig. 7 muestra los niveles de expresión de ARNm de los marcadores de pluripotencialidad Oct4 y nanog y el marcador de senescencia P16 después del cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de dos fuentes diferentes (MSC n.º 1 y n.º 2) en una condición típica (control), en una condición de adición de calcio (Ca^{2+}), en una condición de hipoxia y en una condición de CMH.

La Fig. 8 muestra fotografías de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical teñidas con SA-β-gal después de pases en una condición típica (control) y en una condición de CMH (arriba) y un gráfico en el que la actividad β-gal está representada según condiciones de cultivo después del cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en una condición típica (control), en una condición de adición de calcio (Ca^{2+}), en una condición de hipoxia y en una condición de CMH (abajo).

La Fig. 9 muestra fotografías de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de dos fuentes diferentes (MSC n.º 1 y n.º 2) después de que a las células cultivadas en una condición típica (control) y en una condición de CMH se las indujera a diferenciarse en cartílago y hueso.

La Fig. 10 muestra gráficos que ilustran si dos células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical (MSC n.º 1 y n.º 2) cultivadas en una condición típica (control) y en una condición de CMH estimulan células de respuesta (A), en los que A, B y H representan células de respuesta, células estimuladoras y PHA, respectivamente.

La Fig. 11 muestra gráficos de los niveles de PGE_2 (prostaglandina E_2) liberados de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical (MSC n.º 1 y n.º 2) cultivadas en las condiciones de la Fig. 10.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra los niveles de Tsp-2 liberados de cuatro células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical diferentes (MSC n.º 1 a n.º 4) cultivadas 24 h en una condición típica (control) y en una condición de CMH.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con una realización preferida, la presente invención proporciona un método para el cultivo de células madre mesenquimatosas, que comprende el cultivo de células madre mesenquimatosas en un medio que contiene calcio en una concentración de 3,3 a 3,8 mM y magnesio en una concentración de 1,0 a 3,0 mM en una condición de hipoxia de oxígeno del 2 al 5 %.

El método de cultivo de la presente invención puede aplicarse a células madre mesenquimatosas de varios orígenes. Entre los ejemplos de células madre mesenquimatosas útiles en la presente invención se incluyen las derivadas de sangre de cordón umbilical, médula ósea, lípido, músculo, piel, fluido amniótico, cordón umbilical o dientes, pero no se limitan a los mismos. En una realización preferida de la presente invención, el método de cultivo de la presente invención se aplica a células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical.

Además, las células madre mesenquimatosas a las que puede aplicarse el método de cultivo de la presente invención pueden proceder de varios sujetos. Por ejemplo, las células madre mesenquimatosas útiles en la presente invención pueden obtenerse de mamíferos incluyendo seres humanos, pero no se limitan a los mismos. En una realización preferida de la presente invención, se utilizan células madre mesenquimatosas de origen humano.

El método de cultivo de la presente invención se caracteriza fundamentalmente por el uso de un medio de cultivo que contiene calcio en una concentración de 3,3 a 3,8 mM y magnesio en una concentración de 1,0 a 3,0 mM. El medio de cultivo puede prepararse a partir de un medio de cultivo típico para células madre mediante el ajuste de las concentraciones de calcio y magnesio. Entre los ejemplos del típico medio de cultivo se incluyen el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo (MEM), α-MEM, medio 5A de McCoy, medio basal de Eagle, medio CMRL (Connaught Medical Research Laboratory), medio esencial mínimo Glasgow, medio F-12 de Ham, IMDM (medio Iscove modificado de Dulbecco), medio L-15 de Leibovitz, medio 1640 de RPMI (Roswell Park Memorial Institute), medio 199 y medio Hanks 199, pero no se limitan a los mismos.

Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener o no suero. Además, puede utilizarse un sustituto de suero, en lugar de suero, en el medio de cultivo.

En una realización de la presente invención, el medio de cultivo contiene del 5 al 30 % de suero bovino fetal (FBS). En otra realización, el medio de cultivo contiene un sustituto de suero. Además de un producto disponible comercialmente, pueden utilizarse varios factores de crecimiento en un suero humano o en un lisado de plaquetas humanas, incluyendo PDGF, TGF, IGF y citocinas de una familia de tales proteínas, como sustituto de suero.

En el método de cultivo de la presente invención, el calcio actúa promocionando la proliferación de células madre mesenquimatosas, con la supresión de inmunogenicidad y la estimulación de secreción de citocinas. En este sentido, el calcio puede utilizarse en una concentración de 3,3 a 3,8 mM en el medio, preferentemente en una concentración de aproximadamente 3,6 mM. Por ejemplo, cuando se adopta α-MEM como medio de cultivo, el calcio puede añadirse en una concentración de 1,5 a 2,0 mM y, preferentemente, en una concentración de aproximadamente 1,8 mM porque el medio ya contiene 1,8 mM de calcio. De manera análoga, la concentración de calcio a añadir para conseguir la concentración deseada necesaria para implementar el método de cultivo de la presente invención puede calcularse fácilmente considerando la concentración de calcio de un medio en sí mismo, tomado de entre los medios típicos.

En el medio de cultivo de la presente invención, se utiliza magnesio para prevenir la precipitación de calcio. El magnesio puede emplearse en una concentración de aproximadamente 1,0 a 3,0 mM en el medio y preferentemente en una concentración de aproximadamente 1,8 mM. Por ejemplo, cuando el magnesio está presente en una concentración de menos de 1,0 mM en el medio de cultivo, el calcio tiende a precipitar. Por otro lado, una concentración de magnesio mayor de 3,0 mM en el medio de cultivo es probable que bloquee la formación de la matriz extracelular (ECM), interfiera con la adherencia de las células al fondo de la placa de cultivo, haciéndolas así susceptibles de esfuerzo cortante y que incremente la mineralización intracelular. Por ejemplo, cuando se adopta α-MEM como medio de cultivo, el magnesio puede añadirse en una concentración de 0,2 a 2,2 mM y, preferentemente, en una

concentración de 1,0 mM porque el medio ya contiene una concentración 0,8 mM de magnesio. De manera análoga, la concentración de magnesio a añadir para conseguir la concentración deseada necesaria para implementar el método de cultivo de la presente invención puede calcularse fácilmente considerando la concentración de magnesio de un medio en sí mismo, tomado de entre los medios típicos.

Por tanto, el medio de cultivo según una realización preferida de la presente invención puede basarse en α-MEM suplementado con 5 a 30 % de suero bovino fetal (FBS), de 1,5 a 2,0 mM de calcio y de 0,2 a 2,2 mM de magnesio, sumando así el calcio y el magnesio un total de 3,3 a 3,8 mM y de 1,0 a 3,0 mM, respectivamente.

Asimismo, otra característica del método de cultivo de la presente invención es una condición de cultivo de hipoxia para células madre mesenquimatosas. Comparado con una condición normóxica, la condición de hipoxia promueve la proliferación de células madre mesenquimatosas, con la supresión de inmunogenicidad y la estimulación de secreción de citocinas. En este contexto, la condición de hipoxia es una atmósfera con un contenido de oxígeno del 2 al 5 %. Un problema con una concentración de oxígeno por debajo del 2 % o por encima del 5 % constituye un descenso importante en la proliferación de células madre mesenquimatosas. En una realización preferida de la presente invención, las células madre mesenquimatosas se cultivan en una atmósfera de aproximadamente el 3 % de oxígeno. La condición de hipoxia puede alcanzarse ajustando la concentración de oxígeno de una incubadora de células. Por ejemplo, una incubadora puede purgarse con nitrógeno (100 %) o nitrógeno/dióxido de carbono (95 %/5 %) para ajustar la atmósfera normóxica a una atmósfera hipóxica. La concentración de oxígeno en una incubadora se puede monitorizar mediante un sensor de oxígeno instalado en la incubadora.

Excepto por las condiciones mencionadas anteriormente de la presente invención, las células madre mesenquimatosas pueden cultivarse de una manera convencional. Por ejemplo, las células madre mesenquimatosas pueden cultivarse en un biorreactor tridimensional o centrifugadora o un recipiente de cultivo adherente típico.

Cuando la característica primaria para la concentración de calcio y magnesio se combina con la característica secundaria de la condición de hipoxia, se puede obtener un efecto sinérgico. Es decir, una combinación de la concentración de calcio y magnesio y la condición de hipoxia permite a las células madre mesenquimatosas proliferar de manera más eficiente, con una mayor mejora en la supresión de inmunogenicidad y la estimulación de secreción de citocinas, comparado con las condiciones individuales. Por ejemplo, en condiciones combinadas, las células madre mesenquimatosas proliferan de 1,5 a 5 veces más, con un descenso de 1 a 3 veces en inmunogenicidad y un incremento de 1,5 a 3 veces en la secreción de citocinas, comparado con las condiciones individuales. A la condición combinada para el método de cultivo de la presente invención se le denomina "condición de CMH" (calcio + magnesio + condición de hipoxia).

El método de cultivo de la presente invención puede aplicarse a pases de células madre mesenquimatosas. En otras palabras, las células madre mesenquimatosas cultivadas utilizando el método de cultivo de la presente invención pueden subcultivarse de la misma forma. Permitiendo a las células madre mesenquimatosas proliferar de manera más eficiente, el método de cultivo de la presente invención tiene la ventaja de producir un número mayor de células madre mesenquimatosas incluso realizando menos pases. Por ejemplo, tras 5 pases en los que se inoculó y cultivó el mismo número de células con una duración uniforme en cada pase, se encontró que el método de cultivo de la presente invención producía células madre mesenquimatosas en un número de 100 a 1.000 veces mayor que el de los métodos tradicionales.

Además, las células madre mesenquimatosas desarrolladas mediante el método de cultivo de la presente invención no solo no son inmunogénicas de manera que no causan respuesta inmunitaria, sino que también pueden ser utilizadas eficazmente como agente terapéutico celular o agente regenerador de cartílago en seres humanos.

Las células madre mesenquimatosas, preparadas empleando el método de cultivo, se han mejorado en capacidad proliferativa, viabilidad, tasa de recuperación y propiedad inmunológica. La mejora en la propiedad inmunológica incluye la no inmunogenicidad, la liberación de un inmunosupresor (por ejemplo, PGE_2) para suprimir inmunidad y la mayor liberación de citocinas útiles (por ejemplo, Tsp-2).

Un agente terapéutico celular puede comprender células madre mesenquimatosas. Tal agente terapéutico celular puede encontrar aplicación en la regeneración o protección de adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos, neuronas, cardiomiocitos, hepatocitos, células beta de islote, células vasculares o neumocitos. Además, tal agente terapéutico celular puede ser útil para alguno elegido del grupo que consiste en el tratamiento de enfermedades pulmonares; la supresión o tratamiento de inflamación inducida por enfermedad pulmonar; la regeneración de tejidos pulmonares; y la supresión de fibrosis pulmonar. En particular, puede utilizarse para suprimir o mejorar la inflamación inducida por enfermedad pulmonar y la fibrosis. Adicionalmente, tal agente terapéutico celular puede aplicarse a la terapia de enfermedades cardiovasculares o a la regeneración de cartílago. Además, tal agente terapéutico celular puede reducir respuestas inmunitarias, penetración de células inmunitarias o inmunogenicidad; mejorar funciones inmunomoduladoras; y suprimir reacciones inflamatorias. También, tal agente terapéutico celular puede aplicarse a terapia de enfermedades autoinmunitarias o enfermedades de injerto contra huésped.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar realizaciones preferidas de la presente invención, que no

pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Para su uso en la presente invención, se obtuvieron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de Medipost Co. Ltd., Corea. Las células pueden prepararse recogiendo sangre de cordón umbilical, aislando células madre mesenquimatosas de sangre de cordón umbilical y cultivando las células madre mesenquimatosas, como se ilustra más adelante.

La sangre de cordón umbilical puede recogerse de la vena umbilical que se expulsa fuera del útero mientras la placenta permanece dentro del útero tras un parto vaginal espontáneo normal o una vez que la placenta se ha expulsado del útero tras una cesárea.

Después del nacimiento de un recién nacido, la vena umbilical que se expulsa del útero y por la que el recién nacido está conectado a la placenta debe tratarse asépticamente antes de recoger la sangre de cordón umbilical de la misma.

La sangre de cordón umbilical se retira de la vena umbilical en una bolsa que contiene un anticoagulante a través de una jeringuilla.

Se desvelan métodos para el aislamiento de células madre mesenquimatosas de sangre umbilical y cultivo de células en la patente coreana n.º 10-0494265 y en muchos informes (Pittinger MF, Mackay AM, et al., Science, 284: 143-7, 1999; Lazarus HM, Haynesworth SE, et al., Bone Marrow Transplant, 16: 557-64, 1995). A continuación, se describe brevemente uno de ellos.

Se separan monocitos mediante centrifugación de la sangre de cordón umbilical recogida y se lavan varias veces para eliminar las impurezas de la misma. Después, se siembran los monocitos a una densidad adecuada en un recipiente de cultivo y se dejan crecer con la formación de una capa simple. Las células madre mesenquimatosas son morfológicamente homogéneas y crecen mientas forman colonias que comprenden células en forma de huso, como se observa con un microscopio de contraste de fases. Después, se cultivan las células con pase tras confluencia hasta que se obtiene un número de células necesario.

Ejemplo 1: capacidad proliferativa de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical según la concentración de calcio

Para examinar la capacidad proliferativa de las mismas según la concentración de calcio, se cultivaron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en presencia de varias concentraciones de calcio.

Las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical (MSC n.º 1 y MSC n.º 2) que se habían recogido después del parto con el consentimiento informado de diferentes madres y almacenado en estado de congelación se descongelaron y cultivaron a 37 °C en α-MEM (Invitrogen, EE.UU.) complementado con 10 % de FBS en una condición del 5 % de CO_2 en una incubadora (hipoxia/incubadora de CO_2, Thermo Scientific n.º 3131). Cuando las células crecieron hasta el 80~90 % de confluencia, se las separó en células individuales mediante tratamiento con tripsina. Al α-MEM (complementado con FBS 10 %; que contiene 1,8 mM de calcio y 0,8 mM de magnesio), se añadieron varias concentraciones de calcio (0 mM, 1,5 mM, 3 mM, 4,5 mM, 6 mM y 7,5 mM) de manera que las concentraciones de calcio del medio se ajustaron a: 1,8 mM, 3,3 mM, 4,8 mM, 6,3 mM, 7,8 mM y 9,3 mM. Las células madre mesenquimatosas se inocularon a una densidad de 5.000 células/cm^2 en el medio. Para prevenir la precipitación inducida de calcio, se añadió magnesio a una concentración de 1 mM a cada medio (que contenía una concentración total de magnesio de 1,8 mM). Se cultivaron las células en una condición del 21 % (v/v) de oxígeno (normoxia), con pases tras el 80-90 % de confluencia. Se las contó en cada pase, utilizando un contador de células Cellometer Auto T4 (Nexelcom, Lawrence, Massachusetts, EE.UU.). Los resultados se proporcionan en las Figs. 1A y 1B. Las Figs. 1A y 1B son gráficos que muestran el recuento celular, en veces, con respecto al recuento de células sembradas 7 días (arriba) y los recuentos celulares acumulados hasta 21 días (abajo) después de cultivar células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de dos fuentes diferentes (MSC n.º 1 y n.º 2) en α-MEM al que se le había añadido calcio adicionalmente en diversas concentraciones de 0 a 7,5 mM.

Como puede verse en las Figs. 1A y 1B, la capacidad proliferativa de las células fue máxima cuando se añadió adicionalmente calcio en una concentración de 1,5 mM (una concentración total de calcio de 3,3 mM), lo que también fue observado con el mismo patrón durante los pases. Tras la adición de calcio 3 mM o a una concentración mayor (una concentración total de 4,8 mM o más elevada en el medio), la capacidad proliferativa fue decreciendo gradualmente.

Para determinar una concentración de calcio óptima, el calcio se añadió en concentraciones fraccionadas adicionales hasta un máximo de 3 mM. Los resultados se muestran en las Figs. 2A y 2B. Las Figs. 2A y 2B son gráficos que muestran recuentos celulares después de que las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical derivadas de dos fuentes diferentes (MSC n.º 1 y n.º 2) se cultivaran 7 días en presencia de una concentración de calcio de 1,8 mM, 2,1 mM, 2,4 mM, 2,7 mM, 3,0 mM, 3,3 mM y 3,6 mM (arriba) y durante 6 días en presencia de una concentración total de calcio de 1,8 mM, 3,4 mM, 3,6 mM, 3,8 mM, 4,0 mM, 4,2 mM y 4,4 mM (abajo).

Como se puede ver en los gráficos, la capacidad proliferativa aumentó durante un intervalo de concentración de calcio añadido de 0 a 1,8 mM (concentraciones totales de 1,8 a 3,6 mM en el medio) y entonces comenzó a decrecer cuando la concentración de calcio añadido excedió de 1,8 mM (una concentración total de calcio en el medio de 3,6 mM). A partir de estos resultados, se entiende que la concentración óptima de calcio para permitir la máxima proliferación de células madre mesenquimatosas es 3,6 mM en un medio. Por tanto, es ventajoso, en términos de capacidad proliferativa, que las células madre mesenquimatosas se cultiven en un medio típico con un contenido de calcio preferentemente en una concentración de 2,1 a 4,3 mM y, más preferentemente, en una concentración de 3,3 a 3,8 mM.

Ejemplo 2: capacidad proliferativa de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical según la concentración de oxígeno

Para examinar la capacidad proliferativa de las mismas según la concentración de oxígeno, se cultivaron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en presencia de varias concentraciones de oxígeno.

De manera específica, se cultivaron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de la misma forma que en el Ejemplo 1 en una condición del 3 % o 5 % de oxígeno o en una condición normóxica (nivel de oxígeno en aire del 21 %), con la excepción de que no se añadieron adicionalmente ni calcio ni magnesio al α-MEM complementado con FBS 10 %. Los resultados se proporcionan en las Figs. 3A y 3B. Las Figs. 3A y 3B son gráficos que muestran los tiempos que les llevó a las células duplicarse en número cuando se cultivaron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de dos fuentes diferentes (MSC n.º 1 y n.º 2) en varias condiciones de oxígeno (normal, 3 % y 5 %) después de 1, 2 y 3 rondas de pases (arriba) y recuentos celulares acumulados hasta 21 días después de cultivar células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en las condiciones de oxígeno (abajo).

Como se puede ver en estos gráficos, la capacidad proliferativa se midió con valores más elevados en condiciones hipóxicas que en condiciones normóxicas, aunque hubo diferencias entre lotes. En particular, la capacidad proliferativa fue máxima a un nivel de oxígeno del 3 %, lo que se observó también con el mismo patrón para las células que habían sido cultivadas con muchas rondas de pases. Además, se examinó la capacidad proliferativa de las células para condiciones fraccionadas de oxígeno adicionales hasta un máximo del 5 %. Se prefirió un nivel de oxígeno del 2 al 5 % (datos no mostrados).

Ejemplo 3: capacidad proliferativa de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical según la combinación de condiciones de calcio (que incluye magnesio) y oxígeno

Se examinó la capacidad proliferativa de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical según combinaciones de condiciones de concentración de calcio (que incluye magnesio) y oxígeno. Se cultivaron células en una condición típica (control), en presencia de calcio añadido externamente (que incluye magnesio), en una condición de hipoxia y en una condición de presencia de calcio añadido externamente (que incluye magnesio)/hipoxia (en adelante referida como "CMH"). En este sentido, el medio contenía calcio y magnesio en concentraciones totales de 3,6 y 1,8 M, respectivamente (1,8 mM de calcio y 1 mM de magnesio añadidos adicionalmente). La condición de hipoxia se estableció en un nivel de oxígeno del 3 %. Las células se cultivaron de manera similar a la del Ejemplo 1. Después de 5 pases (P5) en una condición típica, se cultivaron las células madre mesenquimatosas con 7 rondas de pases (P12) en la condición de CMH a intervalos regulares de 7 días entre pases.

Los resultados se proporcionan en la Fig. 4. La Fig. 4 muestra tiempos de duplicación (días) de las células (arriba) y recuentos celulares acumulados (abajo) después de pases en las condiciones.

Como se entiende a partir de los datos de la Fig. 4, la capacidad proliferativa de las células se incrementó de forma significativa cuando se cultivaron en la condición de CMH, comparado con una condición de hipoxia o una condición de adición de calcio. Este efecto se observó con el mismo patrón durante muchas rondas de pases. En experimentos con varios lotes de células se mostraron resultados similares aunque hubo diferencias hasta cierto grado. Por tanto, estos resultados muestran que la condición de CMH de la presente invención es muy efectiva para hacer proliferar células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical.

Ejemplo 4: viabilidad y tasa de recuperación de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical según la condición de cultivo

Se examinó el efecto de la condición de CMH de la presente invención sobre la viabilidad y la tasa de recuperación de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical. Para ello, se cultivaron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical (MSC n.º 1) en una condición típica (control), en una condición de hipoxia (3 %), en una condición de incremento de calcio (1,8 mM; un nivel total de calcio de 3,6 mM en un medio) y en una condición de CMH (3 % de O_2 + calcio añadido 1,8 mM + magnesio añadido 1 mM), se separaron de los recipientes de cultivo y se lavaron tres veces y se suspendieron en un medio fundamental (α-MEM). Mientras se mantenían a temperatura ambiente, se examinaron las suspensiones celulares en cuanto a viabilidad y tasa de recuperación con el tiempo. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de células vivas que murieron después

de que las células recogidas y suspendidas en un medio fundamental se tiñeran con azul de tripán y se contó el total de células incluyendo las células vivas teñidas de azul en un volumen predeterminado (10~20 µL) de la suspensión utilizando un hemocitómetro. La tasa de recuperación se expresó como un porcentaje del recuento de células vivas postcultivo respecto al precultivo.

Los resultados se proporcionan en la Fig. 5. La Fig. 5 muestra la viabilidad celular (gráfico superior) y las tasas de recuperación (gráfico inferior) uno y dos días después del cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en las condiciones.

Como se puede observar en la Fig. 5, se observó que todas las células exhibían mayor viabilidad y tasa de recuperación cuando se cultivaron en condición de hipoxia o en una condición de incremento de calcio respecto a una condición típica e incluso mayor viabilidad y tasa de recuperación cuando se cultivaron en la condición de CMH. Se obtuvieron los mismos resultados con células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical derivadas de fuentes diferentes aunque hubo una diferencia entre ellas hasta cierto grado. Estos datos, considerados en su conjunto, indican que la condición de CMH es ventajosa respecto a una condición típica o las condiciones individuales, al incrementar la viabilidad de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical para recuperar mayores números de células.

Se cultivaron células madre mesenquimatosas (MSC n.º 1 a n.º 4) con pase en una condición típica y en la condición de CMH y se examinó la capacidad proliferativa. Los resultados se proporcionan en las Figs. 6A y 6B que muestran tiempos de duplicación (arriba) y recuentos celulares acumulados (abajo).

Como se puede ver en los gráficos, la condición de CMH redujo de manera significativa el tiempo de duplicación, un índice para la proliferación celular, durante muchas rondas de pases, comparado con el control. Además, como se aprecia a partir de los datos de las curvas de crecimiento acumulado, se obtuvo un número mucho mayor de células madre mesenquimatosas, incluso aunque derivaran de la misma fuente, en la condición de CMH. Se obtuvieron los mismos resultados de experimentos con diferentes células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical aunque hubo una diferencia entre ellos hasta cierto grado. Estos datos indican que la condición de CMH induce a las células madre mesenquimatosas a proliferar con mayor eficacia. En particular, incluso se produjo un número mayor de células madre mesenquimatosas cuando se aplicó la condición de CMH a un pase inicial de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical.

Ejemplo 5: ensayo de pluripotencialidad y senescencia de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical según la condición de cultivo

Para examinar por qué la condición de CMH mejora la proliferación de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical, se ensayaron su pluripotencialidad y senescencia, que están asociadas con la proliferación de células madre.

Para ello, se cultivaron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en una condición típica y en la condición de CMH, como en el Ejemplo 3. Se separaron las células con tripsina cuando alcanzaron el 80~90 % de confluencia. Tras eliminar el medio por centrifugación, se lavaron las células con PBS y se recuperaron mediante centrifugación. Este procedimiento se repitió dos veces hasta retirar completamente el medio de las células. Posteriormente, se aisló el ARN mediante un kit de aislamiento de ARN (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. El ARN se transcribió inversamente en ADNc en presencia de la transcriptasa inversa SuperScript™III (Invitrogen). Se llevó a cabo una PCR en tiempo real sobre el ADNc utilizando cebadores específicos para los marcadores de pluripotencialidad Oct4 y nanog, el marcador de senescencia P16 y GAPDH. La PCR se inició con desnaturalización a 95 °C durante 10 min y se realizó con 30 ciclos de 95 °C durante 10 s, 62 °C durante 30 s y 72 °C durante 10 s en un instrumento de sistema de PCR a tiempo real LightCycler 480 (Roche).

TABLA 1

Cebadores para PCR-TR	
Marcador	Secuencia (F: directo, R: inverso)
Oct4	F; CAATTTGCCAAGCTCCTGA (SEQ ID NO: 1) R; CGTTTGGCTGAATACCTTCC (SEQ ID NO: 2)

(continuación)

Cebadores para PCR-TR	
Marcador	Secuencia (F: directo, R: inverso)
Nanog	F; AGATGCCTCACACGGAGACT (SEQ ID NO: 3) R; TTTGCGACACTCTTCTCTGC (SEQ ID NO: 4)
P16	F; GTGGACCTGGCTGAGGAG (SEQ ID NO: 5) R; CTTTCAATCGGGGATGTCTG (SEQ ID NO: 6)
GAPDH	F; AGCCACCATCGCTCAGACAC (SEQ ID NO: 7) R; GCCCAATACGACCAAATCC (SEQ ID NO: 8)

Los niveles de ARN obtenidos mediante la PCR-TR se normalizaron a los de GADPH antes de comparar los niveles de expresión de ARN para cada marcador en las células cultivadas en la condición típica y en la condición de CMH (análisis relativo, método ddCT).

Los resultados se proporcionan en la Fig. 7. La Fig. 7 muestra los niveles de expresión de ARNm de dos células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical (MSC n.º 1 y MSC n.º 2).

Como se puede observar en la Fig. 7, los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencialidad Oct4 y nanog fueron mayores en las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical cultivadas en la condición de CMH que en una condición típica (control) y que en condiciones individuales. El marcador de senescencia P16 mostró un patrón de expresión inverso al del Oct4. Estos resultados indican que la condición de CMH mantiene la pluripotencialidad de las células madre mesenquimatosas mientras suprime la senescencia, mejorando así la capacidad proliferativa.

Para confirmar la capacidad de la condición de CMH para suprimir la senescencia de las células madre mesenquimatosas, se llevaron a cabo los siguientes experimentos. Se cultivaron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en una condición típica y en la condición de CMH como en el Ejemplo 3, con 7-8 pases. Después de la eliminación del medio, las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 - 5 min con 1 mL de una solución de fijación 1x (Cell Signaling Technology). La solución de fijación se eliminó de las células que después se lavaron dos veces con 2 mL de PBS. Posteriormente, se incubaron las células de 2 a 24 h con 1 mL de una solución colorante para la β-galactosidasa (Cell Signaling Technology) en una incubadora a 37 °C. Después de eliminar la solución colorante, se lavaron las células con 1 mL de PBS y las células teñidas senescentes resultantes se contaron en un microscopio invertido ECLIPSE TE2000-U (Nikon Co., Kanagawa, Japón).

Los resultados se proporcionan en la Fig. 8. La Fig. 8 muestra microfotografías de células después de la tinción con SA-β-gal (arriba) y los gráficos de actividad de SA-β-gal (abajo). La actividad SA-β-gal se determinó calculando la proporción de células teñidas respecto al total de células contadas en una fotografía magnificada 40-100 veces.

Como se aprecia en la Fig. 8, la progresión de la senescencia en las células madre mesenquimatosas se retrasó más en la condición de CMH que en la condición de adición de calcio o la condición de hipoxia y mucho más que en la condición típica.

Tomados en conjunto, los datos obtenidos más arriba demuestran que la condición de CMH de la presente invención mantiene la pluripotencialidad y suprime la senescencia más eficientemente de lo que lo hacen las condiciones típicas o las condiciones individuales, por lo que las células madre mesenquimatosas pueden proliferar con elevada eficacia.

Ejemplo 6: potencial de diferenciación y expresión de marcadores de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical según la condición de cultivo

Se examinó el efecto de la condición de CMH sobre las propiedades de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical. Con este fin, se ensayó el potencial de diferenciación y la expresión de marcadores de las células madre mesenquimatosas mediante inducción condrogénica e inducción osteogénica.

Las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical obtenidas de dos fuentes diferentes (MSC n.º 1 y n. º 2) se cultivaron en una condición típica (control) y en la condición de CMH, como en el Ejemplo 3, antes de que se las indujera a diferenciarse en cartílago y hueso, como se expone a continuación. Después, se evaluó la diferenciación en cartílago y hueso mediante un método de tinción.

Inducción condrogénica

Para su uso en la inducción condrogénica, las células se colocaron en una población de 2~2,5 x 10^5 células en una probeta cónica de 15 mL y se centrifugaron para obtener un sedimento celular. Se lavó con D-PBS y se suspendió en 200-250 µl de un medio de diferenciación [DMEM de alta concentración de glucosa (Gibco, cat. n.º 11995), 10 ng/ml de TGFβ-3 (Sigma, cat. n.º T5425, 2 µg), 500 ng/ml de BMP-6 (R&D, cat. n.º 507-BP, 20 µg), 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma, cat. n.º A8960), 50 mg/ml de (1:100) ITS™+ Premix (BD, cat. n.º 354352), 40 µg/ml de L-prolina

(Sigma, cat. n.º P5607), 100 µg/ml de ácido pirúvico de sodio (Sigma, cat. n.º P8574), dexametasona 100 nM (Sigma, cat. n.º D2915)] y se hicieron alícuotas de la suspensión celular en probetas. Las probetas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min, después de lo cual las células se cultivaron durante 4 semanas a 37 °C en una incubadora de CO_2, con las probetas ligeramente abiertas, para inducir la diferenciación en cartílago. El medio de diferenciación se sustituyó por la mitad con uno fresco, dos veces a la semana.

Protocolo de tinción de cartílago

Después de la inducción condrogénica, se centrifugaron las células, se lavaron con PBS y se fijaron a temperatura ambiente durante 0,5 a 1 h en paraformaldehído al 4%. Posteriormente, se lavaron las células dos o tres veces con agua destilada y se prepararon en secciones (4~5 µm de grosor) utilizando un método de criosección. Las secciones se sumergieron durante 3-5 min en etanol al 95 % y se lavaron dos veces con agua. Después de teñirse durante 7 min con safranina O al 0,1%, las células se lavaron dos veces con etanol al 70 %, una con etanol al 70 %, dos veces con etanol al 95 %, una con etanol al 95 % y dos veces con etanol al 100 %, se sumergieron durante 3 min en una solución de sustrato de xileno y se secaron. Después de eso, las células teñidas se cubrieron con una solución de montaje liposoluble y se observaron. La inducción condrogénica se evaluó mediante la comparación del color (violeta), el tamaño de los sedimentos diferenciados y la estructura de laguna formada.

Inducción osteogénica

Para su uso en inducción osteogénica, las células se sembraron en placas con una densidad de 500 ~ 1000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y 2 ~ 4 días después, se sustituyó el medio con un medio de inducción osteogénica (2,1604 g de fosfato de β-glicerol, 0,012805 g de ácido L-ascórbico-2-fosfato, 0,6 mg de dexametasona/UVAB, 5 ml de gentamicina (10 mg/ml) y 100 ml de FBS en 1 L de α-MEM). Las células se cultivaron durante 2 ~ 3 semanas con el medio de diferenciación sustituido con uno fresco cada tres días. La inducción condrogénica se evaluó mediante un método de tinción ALP.

Protocolo de tinción de hueso

Las células diferenciadas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 30~45 s en una solución de fijación (acetona al 40%). Se lavaron de nuevo dos o tres veces con agua destilada y se incubaron durante 30 min con una solución de tinción alcalina (sal de violeta B rápida) en un sitio oscuro. Después, las células se lavaron dos veces con agua destilada y se trataron con solución de hematoxilina de Mayer durante 10 - 20 seg. Después de eliminar de la misma la solución colorante, se lavaron las células con agua potable, se secaron, se cubrieron con una solución de montaje liposoluble y se observaron. Dado que los osteoblastos se tiñen de marrón oscuro debido a la activación de la fosfatasa alcalina intracelular, la inducción condrogénica se evaluó mediante el grado de tinción.

Los resultados se proporcionan en las Figs. 9A y 9B. Como puede verse en las Figs. 9A y 9B, básicamente no hubo diferencias en la inducción condrogénica y en la inducción osteogénica entre células madre mesenquimatosas cultivadas en la condición típica y en la condición de CMH.

Mientras tanto, se examinaron los inmunofenotipos de los antígenos de la superficie celular de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical cultivadas según el método de la presente invención. En este contexto, la expresión de los marcadores de superficie (CD34, CD73, CD45 y CD105) se analizó mediante FACS.

Se tripsinizaron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical cultivadas en una condición típica y en la condición de CMH y se lavaron tres veces con PBS que contenía FBS al 2 %. Se las dejó reaccionar con los antígenos asociados a células hematopoyéticas CD34 y CD45, ambos conjugados con FITC (isotiocianato de fluoresceína), el antígeno asociado a inmunomodulación CD73 conjugado con PE (ficoeritrina) y el antígeno asociado a angiogénesis CD105 conjugado con PE. A continuación, se marcó adicionalmente a las células con un segundo anticuerpo (IgG-FITC; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pensilvania, EE.UU.) de un modo similar a la transferencia de Western, seguido de la detección de la señal del segundo anticuerpo utilizando FACS en proporciones de las células que expresan los marcadores respecto al total de células. Después de la reacción, se analizaron las señales utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, California, EE.UU.) y el programa informático CEL - LQUEST.

Los resultados se resumen en la Tabla 2, más adelante.

TABLA 2

		CD34	CD73	CD45	CD105
MSC n.º 1	Control	-	+	-	+
	CMH	-	+	-	+
MSC n.º 2	Control	-	+	-	+
	CMH	-	+	-	+
MSC n.º 3	Control	-	+	-	+
	CMH	-	+	-	+

Como se entiende a partir de los datos de la Tabla 2, no hubo diferencias significativas en la expresión de las proteínas de marcadores entre células cultivadas en la condición de CMH y la condición típica.

Tomados en conjunto, los datos arriba obtenidos demuestran que la condición de CMH de la presente invención no influye de forma significativa en las propiedades fundamentales de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical.

Ejemplo 7: comparación de inmunogenicidad e inmunosupresión de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical según la condición de cultivo

Las propiedades inmunológicas de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical según las condiciones de cultivo se evaluaron utilizando una reacción mixta de linfocitos (MLR) como sigue.

Para un control negativo, las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical cultivadas en presencia de 10 µg/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich, San Louis, Misuri, EE.UU.) en una condición típica y en la condición de CMH se sembraron por separado a una densidad de 2 x 10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos, las células de respuesta (monocitos sanguíneos periféricos (expresados como "A"); ALLCELLS, Emeryville, California) a una densidad de 1 x 10^5 células/pocillo y las células estimuladoras (monocitos sanguíneos periféricos no relacionados (expresados como "B"); ALLCELLS, Emeryville, California) a una densidad de 1 x 10^5 células/pocillo. Como control positivo (1), se añadieron monocitos sanguíneos periféricos tratados con 10 µg/ml de PHA-L (expresados como "H"; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) a una densidad de 1 x 10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Para un control positivo (2), las células de respuesta y las células estimuladoras se añadieron a una densidad de 1 x 10^5 células/pocillo. En un grupo de prueba, las células madre mesenquimatosas se incubaron con monocitos sanguíneos periféricos, monocitos sanguíneos periféricos estimulados-L-PHA o una combinación de las células de respuesta y las células estimuladoras, empleando cada monocito a una densidad de 1 x 10^5 células, durante 5 días, y se observaron al microscopio la proliferación y la formación de colonias de las células de respuesta. En el día 5 después de la incubación, se trataron las células con BrdU (BD Bioscience, San José, California, EE.UU.) de manera que los niveles de ADN recientemente sintetizado durante las 24 h previas en las células de respuesta se determinó mediante la medición de la absorbancia a 370 nm en un lector de microplacas VERSAmax™ (Molecular Devices Co., Sunnyvale, California, EE.UU.).

Los resultados se muestran en la Fig. 10. Como se puede observar en la Fig. 10, se indujo la proliferación en los monocitos sanguíneos periféricos no relacionados estimulados por PHA-L(H) (A+H) si bien las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical no estimularon a las células de respuesta, no obteniéndose así, como resultado, ninguna inducción de proliferación celular (hUCB-MSC+A). En particular, se observó que las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical tenían mayores efectos inhibitorios en la proliferación de las células de respuesta cuando se cultivaron en la condición de CMH que cuando se cultivaron en una condición típica. Estos datos indican que las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical cultivadas en el CMH suelen ser menos inmunogénicas que las cultivadas en una condición típica.

Cuando se aplicaron a la situación en la que la respuesta inmunitaria se indujo por una reacción entre las células de respuesta (A) y las células estimuladoras (B), es decir, (A+B) o mediante la estimulación artificial de las células de respuesta (A) con PHA-L, es decir, (A+H), se observó que las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical cultivadas en la condición de CMH reprimían la proliferación de los monocitos sanguíneos periféricos de respuesta en mayor medida de lo que lo hicieron las que se cultivaron en la condición típica. Se obtuvieron resultados similares con células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de diferentes fuentes aunque hubo una diferencia hasta cierto, pero ligero, grado. Estos datos demuestran que la condición de cultivo de CMH es ventajosa sobre condiciones típicas en términos de supresión de inmunogenicidad.

Después de que se dejaran reaccionar las células madre mesenquimatosas de la misma manera que se describió anteriormente, se analizó la PGE_2 (prostaglandina E_2), un inmunosupresor, liberada utilizando un kit ELISA PGE2 (Cayman, Ann Arbor, Michigan, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. Los cultivos de la MLR se utilizaron como especímenes.

Se prepararon los estándares necesarios para el ensayo ELISA para tener una densidad máxima de 1.000 pg/mL, con una densidad mínima de 7,8 pg/mL diluida a la mitad de manera seriada desde el máximo. Se añadieron cada uno de

los estándares y de los sobrenadantes de cultivo del grupo de prueba en una cantidad de 50 µl a cada pocillo de las placas revestidas de anticuerpos de captura de PGE_2. Después, se añadieron a cada pocillo 50 µl del localizador AchE de PGE_2 y 50 µl de un anticuerpo primario, seguido de incubación a 4 °C durante 18 h. Las placas se lavaron cinco veces con un tampón de lavado y se añadieron 200 µl del reactivo de Ellman (incluido en el kit), seguido de la adición de 5 µl del localizador por pocillo. Las placas se incubaron durante 60 ~ 90 min en condiciones de oscuridad y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Los resultados se proporcionan en la Fig. 11. Como se puede observar en la Fig. 11, se observó que las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical liberaron PGE_2 en una cantidad aproximadamente 3,7 veces mayor cuando se cultivaron en la condición de CMH que en una condición típica. Se obtuvieron resultados similares con diferentes células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical. Estos datos demuestran que las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical cultivadas en la condición CHM fueron más inmunosupresoras que las cultivadas en una condición típica.

Ejemplo 8: ensayo *in vitro* para la capacidad de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de liberar citocinas según la condición de cultivo

Se ensayaron los efectos de las condiciones de cultivo sobre la capacidad de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical para liberar citocinas midiendo la Tsp-2 liberada durante la diferenciación de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en condrocitos.

Se cultivaron células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical en una condición típica (control) y en la condición de CMH de la misma forma que en el Ejemplo 3. Cuando alcanzaron el 80~90 % de confluencia, se las separó mediante tratamiento con tripsina. Tras la centrifugación, los sedimentos celulares se lavaron con DMEM de alta concentración de glucosa que contenía 40 µg/ml de L-prolina, 0,6 µg/ml de dexametasona, 50 µg/ml de ácido ascórbico y 100 µg/ml de piruvato sódico, hasta retirar completamente el FBS de las células. Los sedimentos de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical obtenidos de nuevo por centrifugación se suspendieron a una densidad de $2,0 \times 10^5$ células/400 µl y se depositaron en una alícuota de 400 µl en probetas cónicas de 15 mL. Después de la centrifugación a 550 x g durante 5 min, las probetas se cerraron muy ligeramente. Las probetas de incubaron durante 24 h permaneciendo verticales en una rejilla. Una vez se formó un sedimento, se recogió el sobrenadante y se analizó el nivel de Tsp-2 mediante un kit de ensayo Tsp-2 (R&D systems, EE.UU.).

Los resultados se proporcionan en la Fig. 12. El Tsp-2 es un factor de recuento para valorar las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical para emplearlas como un agente regenerador de cartílago. Se evaluó que las células que liberaron mayor nivel de Tsp-2 regeneraban cartílago con mayor eficacia. Como se entiende a partir de los datos de la Fig. 12, los cuatro tipos diferentes de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical liberaron mayores niveles de Tsp-2 en la condición de CMH que en una condición típica.

Tomados en conjunto, los datos obtenidos más arriba indican que las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical cultivadas en la condición de CMH tienen un potencial de diferenciación en condrocitos excelente y, por tanto, son útiles como agente regenerador de cartílago.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MEDIPOST CO., LTD.

<120> MÉTODO PARA CULTIVAR CÉLULAS MADRE MESENQUIMATOSAS

<130> PCB304020MED

<150> KR 2012-0097193
<151> 2012-09-03

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo para Oct4

<400> 1
caatttgcca agctcctga 19

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso para Oct4

<400> 2
cgtttggctg aataccttcc 20

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo para Nanog

<400> 3
agatgcctca cacggagact 20

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso para Nanog

<400> 4
tttgcgacac tcttctctgc 20

<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo para P16

<400> 5
gtggacctgg ctgaggag 18

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso para P16

<400> 6
ctttcaatcg gggatgtctg 20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo para GAPDH

<400> 7
agccaccatc gctcagacac 20

<210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso para GAPDH

<400> 8
gcccaatacg accaaatcc 19

REIVINDICACIONES

1. Un método para el cultivo de células madre mesenquimatosas, que comprende el cultivo de células madre mesenquimatosas en un medio que contiene calcio en una concentración de 3,3 a 3,8 mM y magnesio en una concentración de 1,0 a 3,0 mM en una condición de hipoxia de oxígeno del 2 al 5 %.

2. El método de la reivindicación 1, en el que las células madre mesenquimatosas derivan de sangre de cordón umbilical, médula ósea, lípido, músculo, piel, fluido amniótico, cordón umbilical o dientes.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el medio se selecciona del grupo consistente en un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), un medio esencial mínimo (MEM), un α-MEM, un medio 5A de McCoy, un medio basal de Eagle, un medio CMRL (Connaught Medical Research Laboratory), un MEM de Glasgow, un medio F-12 de Ham, un IMDM (medio Iscove modificado de Dulbecco), un medio L-15 de Leibovitz, un medio 1640 de RPMI (Roswell Park Memorial Institute), un medio 199 y un medio Hanks 199.

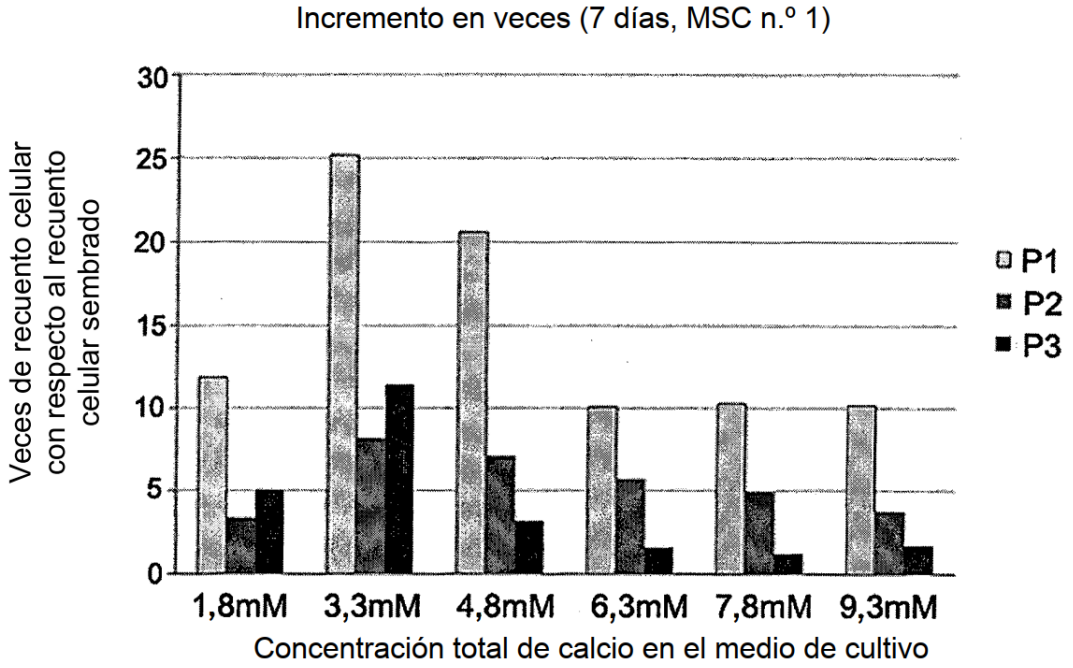
4. El método de la reivindicación 3, en el que el medio comprende del 5 al 30 % de suero bovino fetal.

5. El método de la reivindicación 3, en el que el medio no comprende el suero fetal bovino, sino un sustituto de suero.

6. El método de la reivindicación 1, en el que el medio está basado en un α-MEM complementado con 5 a 30 % de suero bovino fetal (FBS), 1,5 a 2,0 mM de calcio y 0,2 a 2,2 mM de magnesio.

7. El método de la reivindicación 1, en el que las células madre mesenquimatosas se subcultivan en la misma condición que en la reivindicación 1.

FIG. 1A


Incremento en veces (7 días, MSC n.º 1)
Veces de recuento celular con respecto al recuento celular sembrado
30
25
20
15
10
5
0
1,8mM
3,3mM
4,8mM
6,3mM
7,8mM
9,3mM
Concentración total de calcio en el medio de cultivo
P1
P2
P3

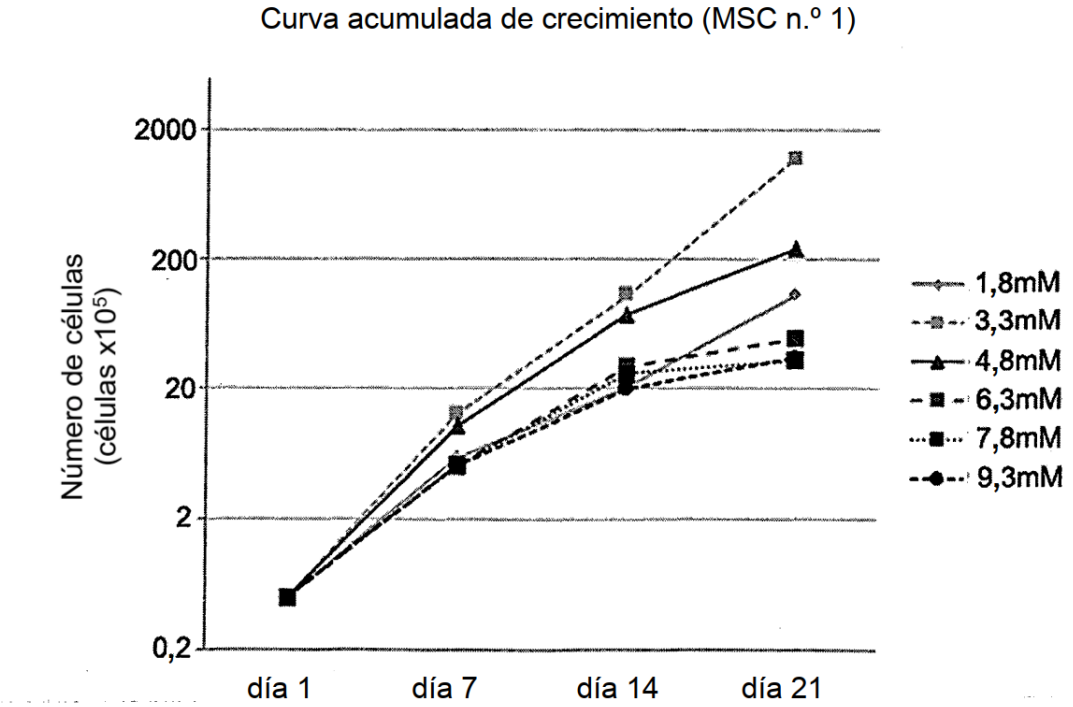
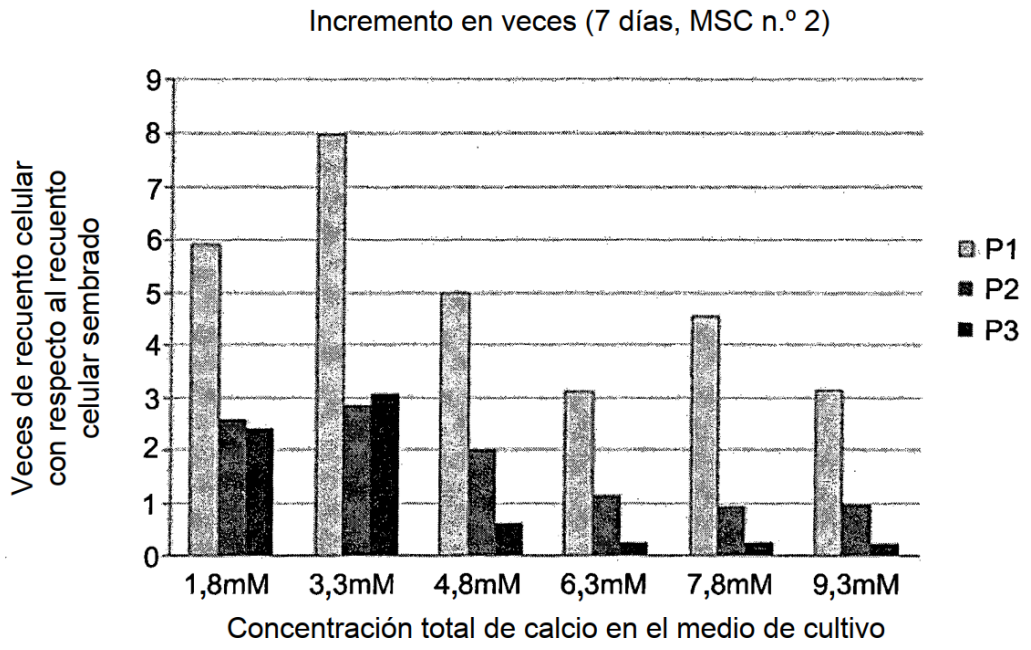

Curva acumulada de crecimiento (MSC n.º 1)
Número de células (células x10⁵)
2000
200
20
2
0,2
día 1
día 7
día 14
día 21
1,8mM
3,3mM
4,8mM
6,3mM
7,8mM
9,3mM

FIG. 1B


Incremento en veces (7 días, MSC n.º 2)
Veces de recuento celular con respecto al recuento celular sembrado
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1,8mM
3,3mM
4,8mM
6,3mM
7,8mM
9,3mM
Concentración total de calcio en el medio de cultivo
P1
P2
P3

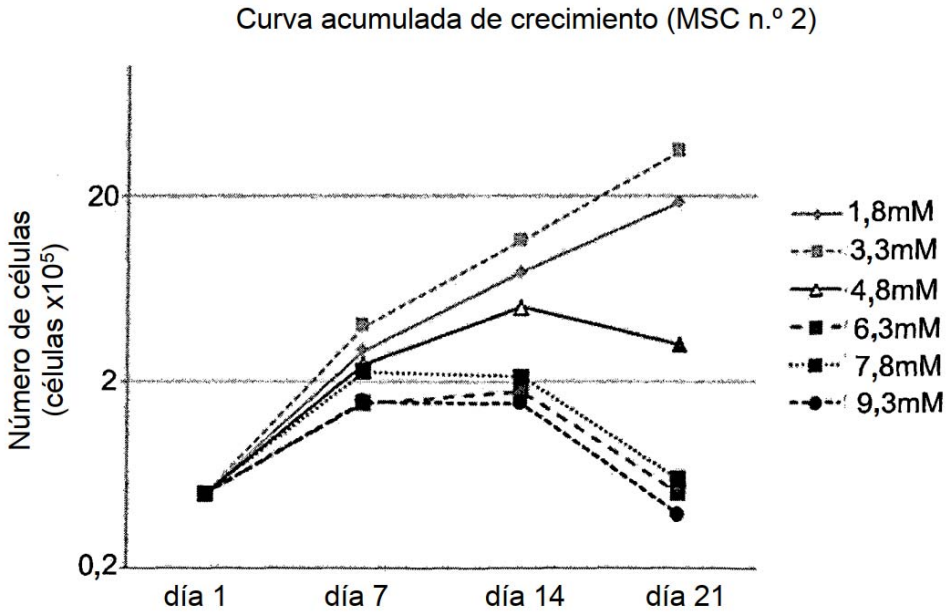
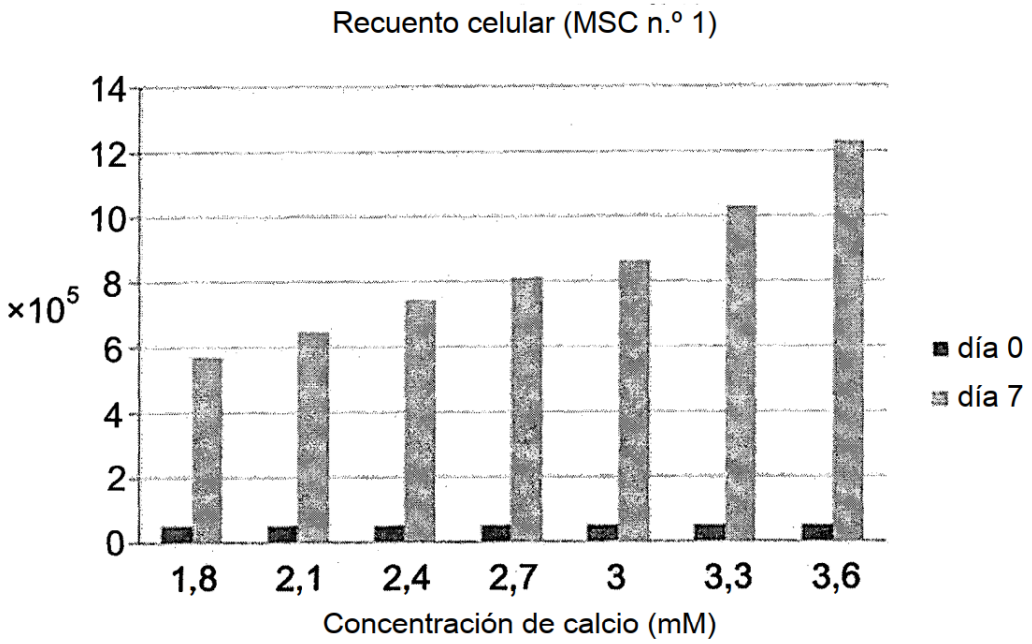

Curva acumulada de crecimiento (MSC n.º 2)
Número de células (células x10⁵)
20
2
0,2
día 1
día 7
día 14
día 21
1,8mM
3,3mM
4,8mM
6,3mM
7,8mM
9,3mM

FIG. 2A


Recuento celular (MSC n.º 1)
×10^5
14
12
10
8
6
4
2
0
1,8
2,1
2,4
2,7
3
3,3
3,6
Concentración de calcio (mM)
día 0
día 7

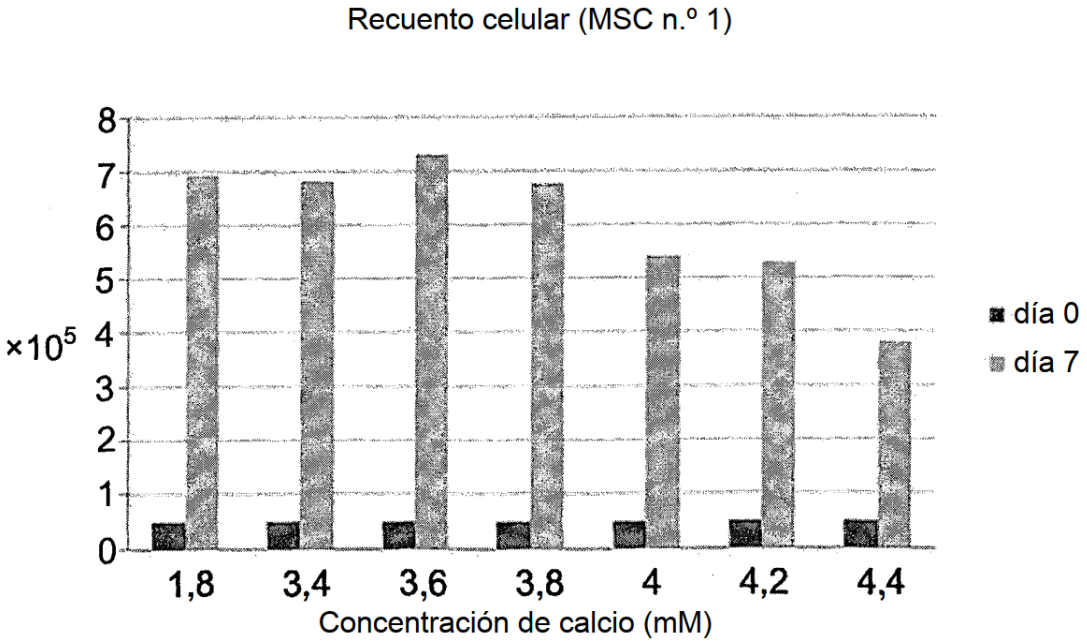
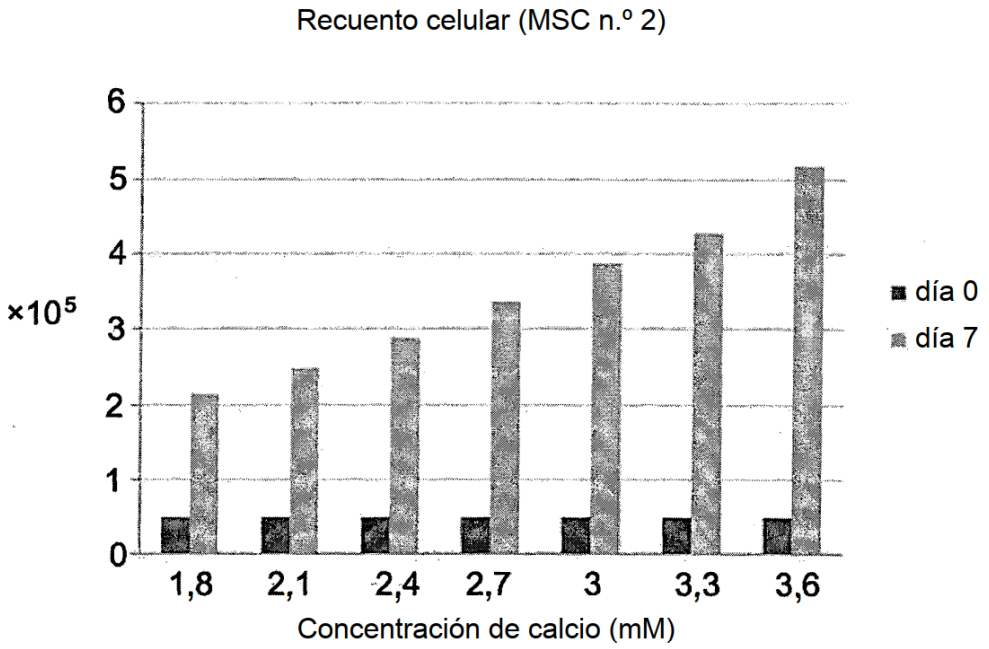

Recuento celular (MSC n.º 1)
×10^5
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1,8
3,4
3,6
3,8
4
4,2
4,4
Concentración de calcio (mM)
día 0
día 7

FIG. 2B


Recuento celular (MSC n.º 2)
×10⁵
6
5
4
3
2
1
0
1,8
2,1
2,4
2,7
3
3,3
3,6
Concentración de calcio (mM)
día 0
día 7

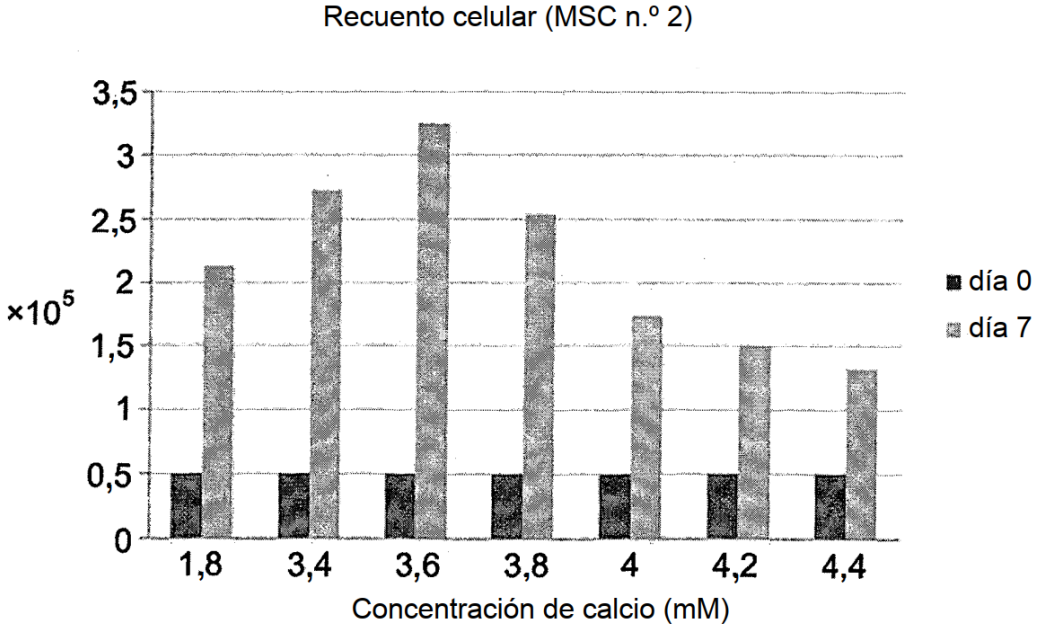

Recuento celular (MSC n.º 2)
×10⁵
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1,8
3,4
3,6
3,8
4
4,2
4,4
Concentración de calcio (mM)
día 0
día 7

FIG. 3A

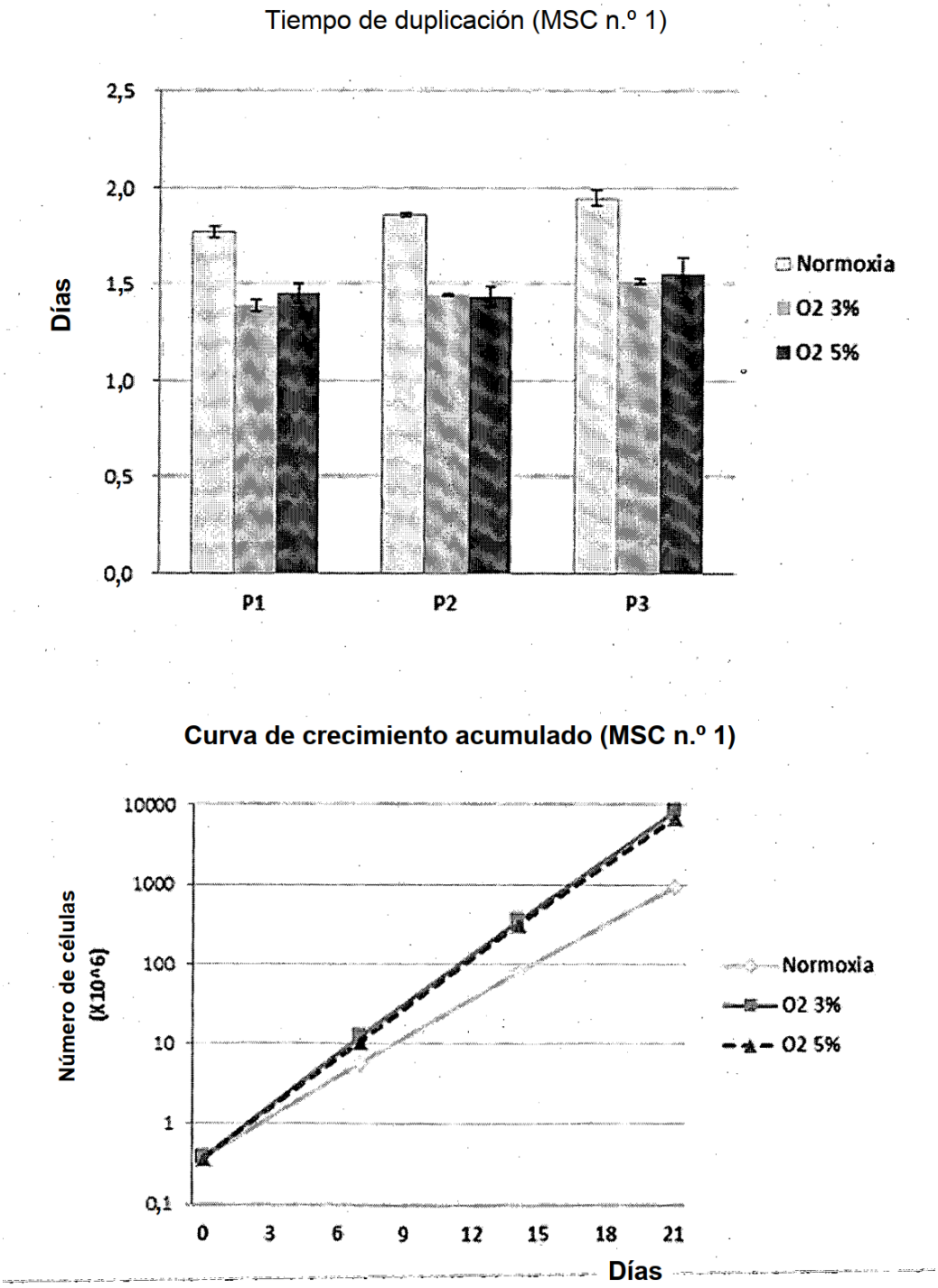

Tiempo de duplicación (MSC n.º 1)
Días
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
P1
P2
P3
Normoxia
O2 3%
O2 5%
Curva de crecimiento acumulado (MSC n.º 1)
Número de células (X10^6)
10000
1000
100
10
1
0,1
0
3
6
9
12
15
18
21
Días
Normoxia
O2 3%
O2 5%

FIG. 3B

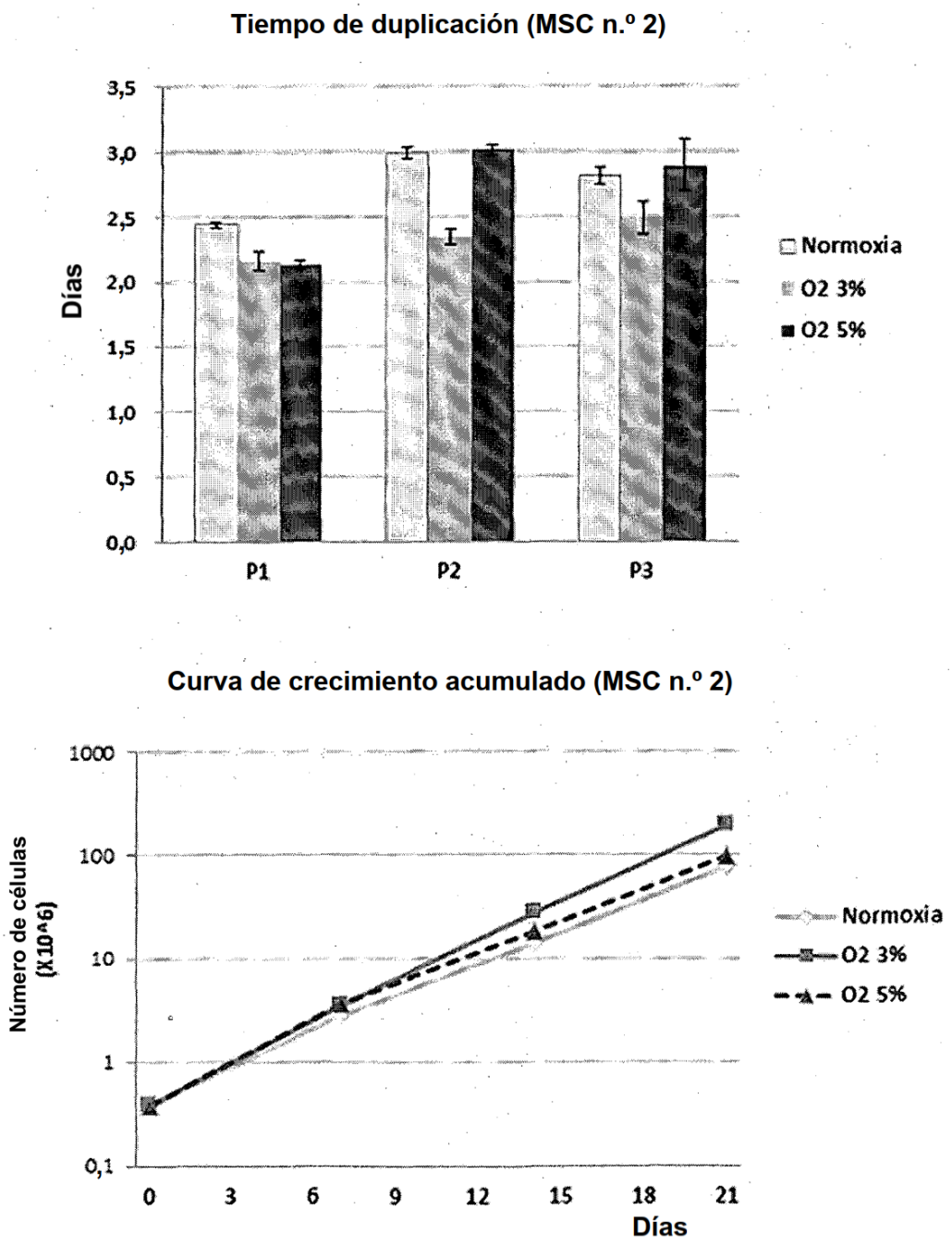

Tiempo de duplicación (MSC n.º 2)
Días
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
P1
P2
P3
Normoxia
O2 3%
O2 5%
Curva de crecimiento acumulado (MSC n.º 2)
Número de células (X10^6)
1000
100
10
1
0,1
0
3
6
9
12
15
18
21
Días
Normoxia
O2 3%
O2 5%

FIG. 4

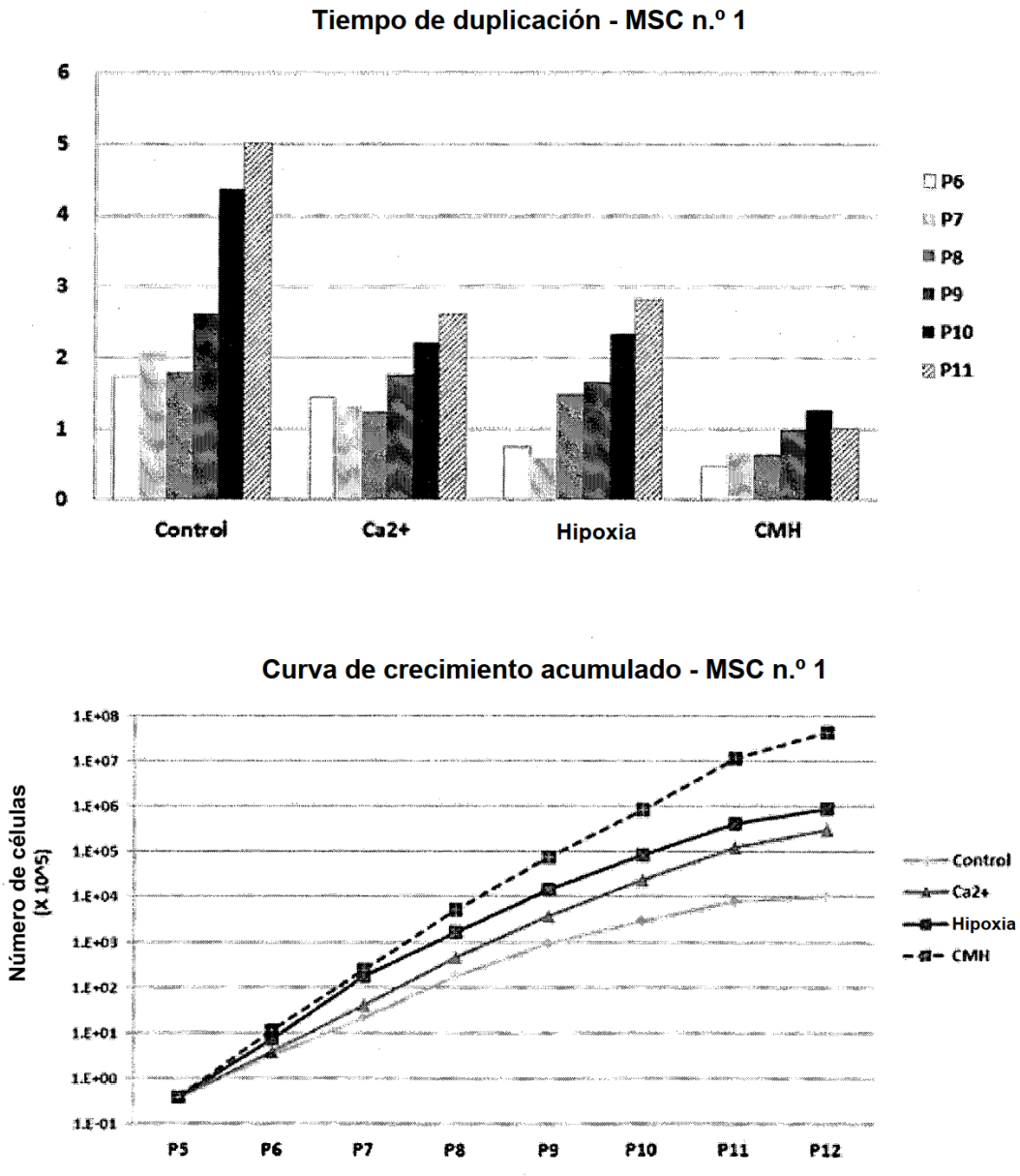

Tiempo de duplicación - MSC n.º 1
6
5
4
3
2
1
0
Control
Ca2+
Hipoxia
CMH
P6
P7
P8
P9
P10
P11
Curva de crecimiento acumulado - MSC n.º 1
Número de células
(X 10^5)
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
1.E-01
P5
P6
P7
P8
P9
P10
P11
P12
Control
Ca2+
Hipoxia
CMH

FIG. 5

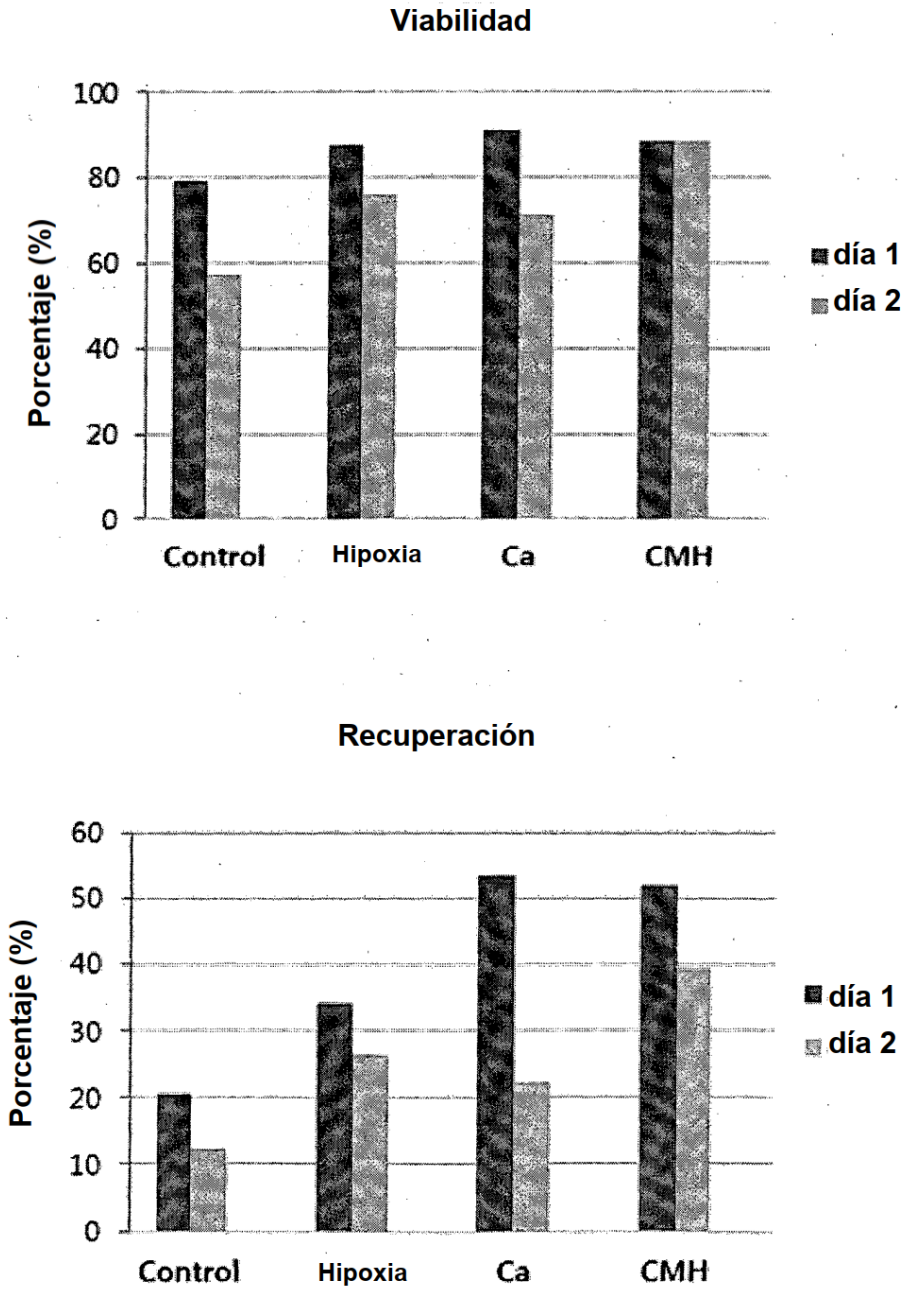

Viabilidad
Porcentaje (%)
100
80
60
40
20
0
Control
Hipoxia
Ca
CMH
día 1
día 2
Recuperación
Porcentaje (%)
60
50
40
30
20
10
0
Control
Hipoxia
Ca
CMH
día 1
día 2

FIG. 6A

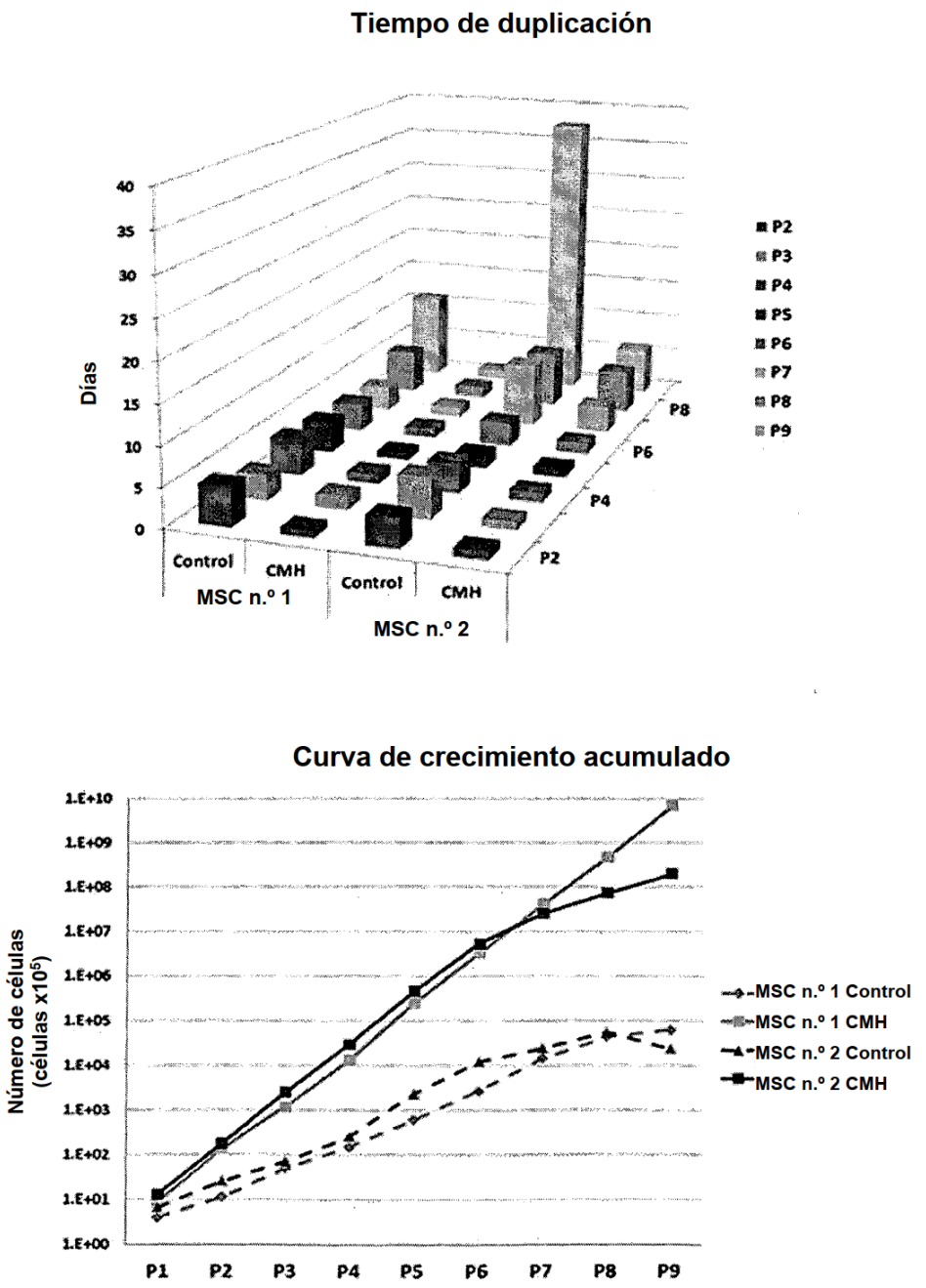

Tiempo de duplicación
Días
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Control
CMH
Control
CMH
MSC n.º 1
MSC n.º 2
P2
P4
P6
P8
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P9
Curva de crecimiento acumulado
Número de células (células x10⁵)
1.E+10
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P9
MSC n.º 1 Control
MSC n.º 1 CMH
MSC n.º 2 Control
MSC n.º 2 CMH

FIG. 6B

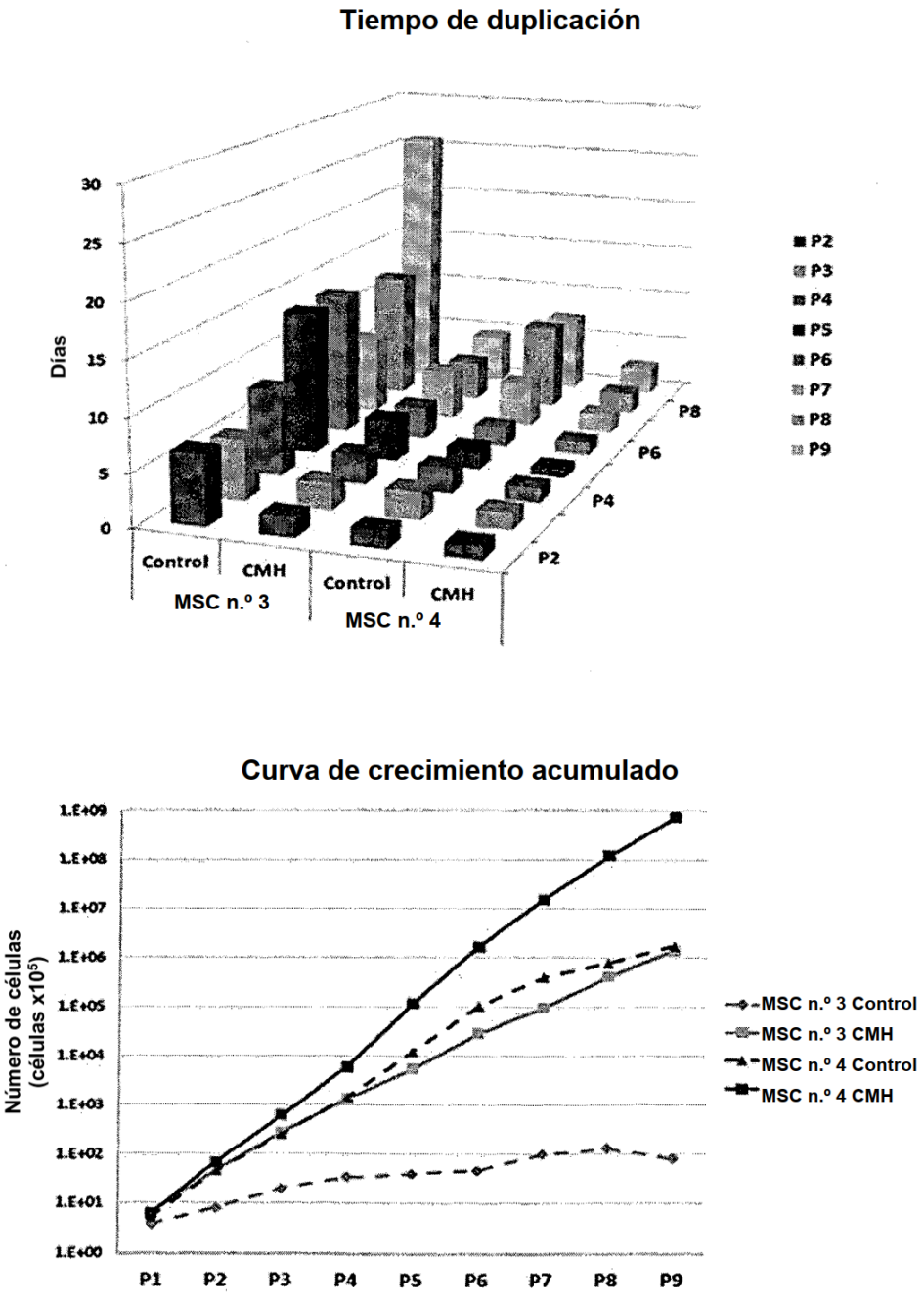

Tiempo de duplicación
Días
30
25
20
15
10
5
0
Control
CMH
Control
CMH
MSC n.º 3
MSC n.º 4
P2
P4
P6
P8
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P9
Curva de crecimiento acumulado
Número de células (células x10⁵)
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P9
MSC n.º 3 Control
MSC n.º 3 CMH
MSC n.º 4 Control
MSC n.º 4 CMH

FIG. 7

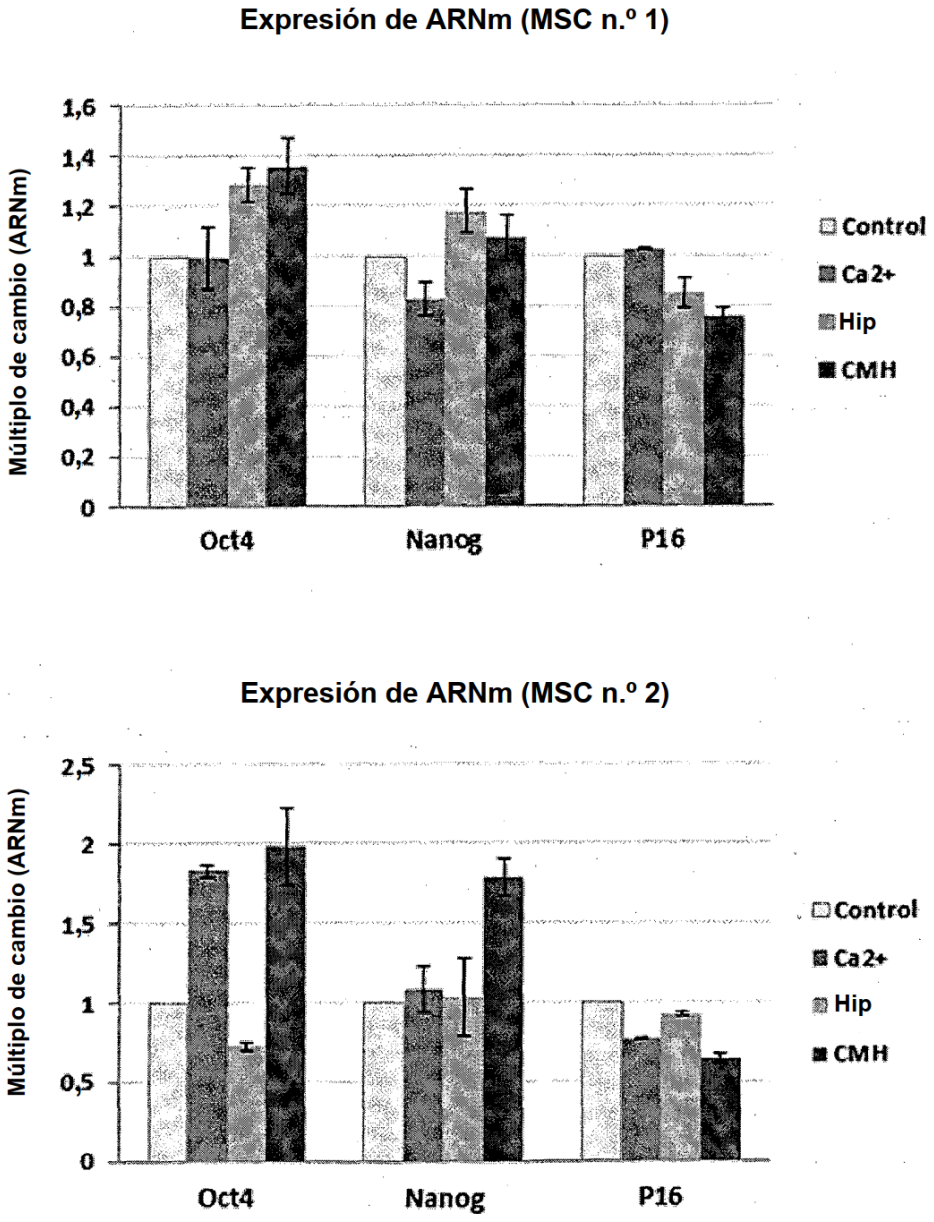
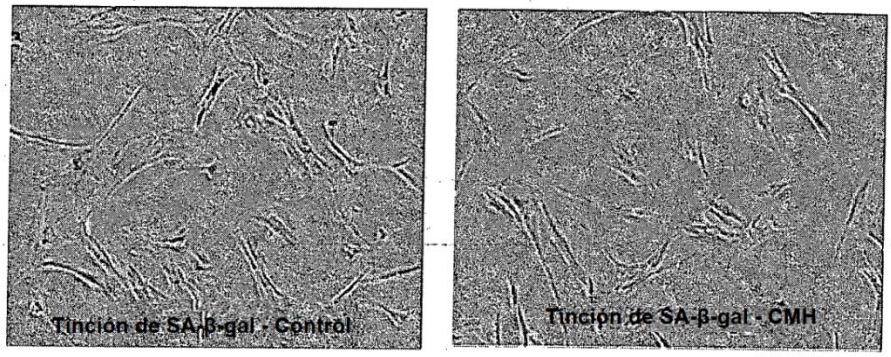

Expresión de ARNm (MSC n.º 1)
Múltiplo de cambio (ARNm)
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Oct4
Nanog
P16
Control
Ca2+
Hip
CMH
Expresión de ARNm (MSC n.º 2)
Múltiplo de cambio (ARNm)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Oct4
Nanog
P16
Control
Ca2+
Hip
CMH

FIG. 8


Tinción de SA-β-gal - Control
Tinción de SA-β-gal - CMH

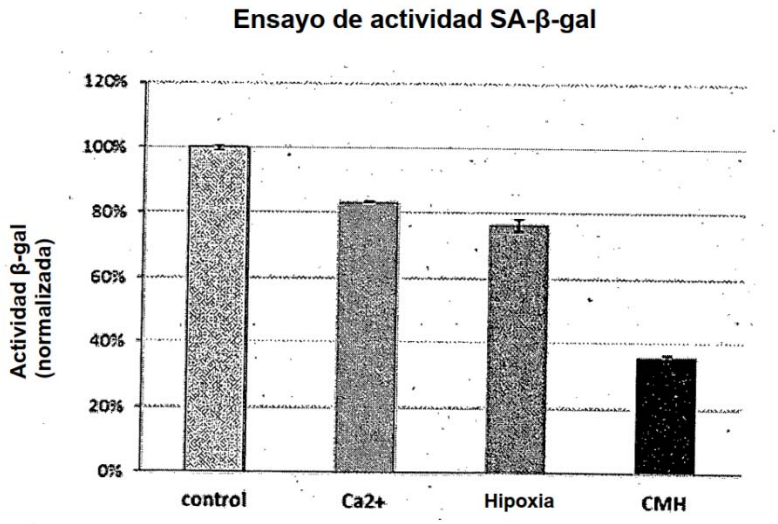

Ensayo de actividad SA-β-gal
Actividad β-gal (normalizada)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
control
Ca2+
Hipoxia
CMH

FIG. 9A

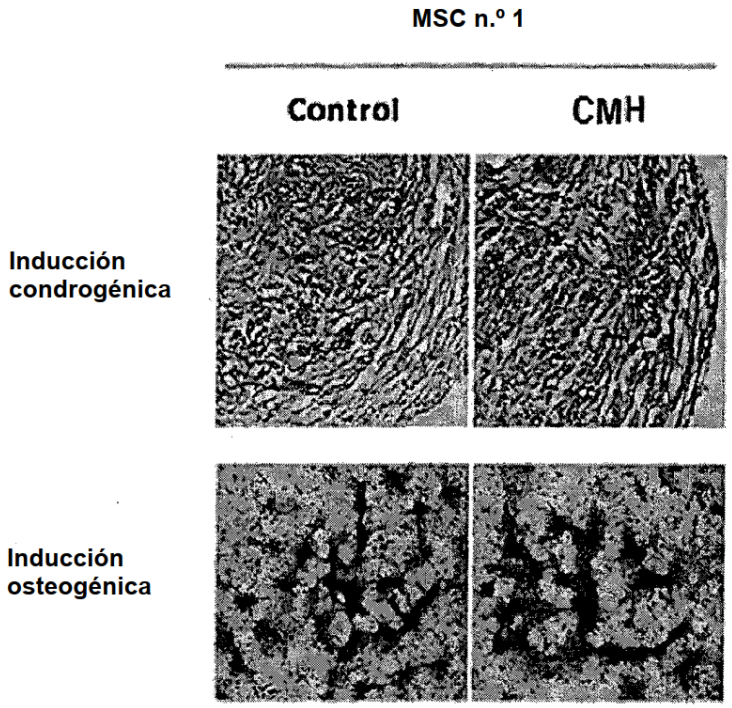

MSC n.º 1
Control
CMH
Inducción condrogénica
Inducción osteogénica

FIG. 9B

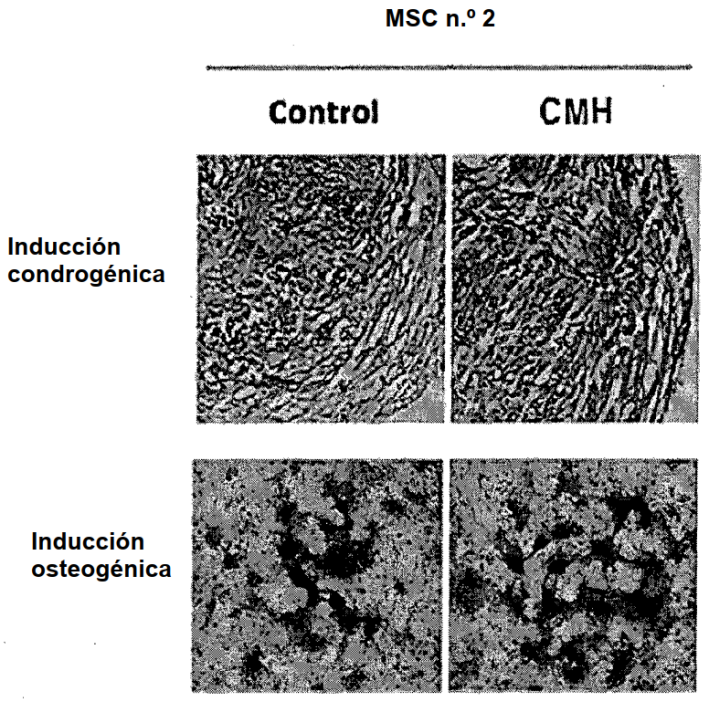

MSC n.º 2
Control
CMH
Inducción condrogénica
Inducción osteogénica

FIG. 10

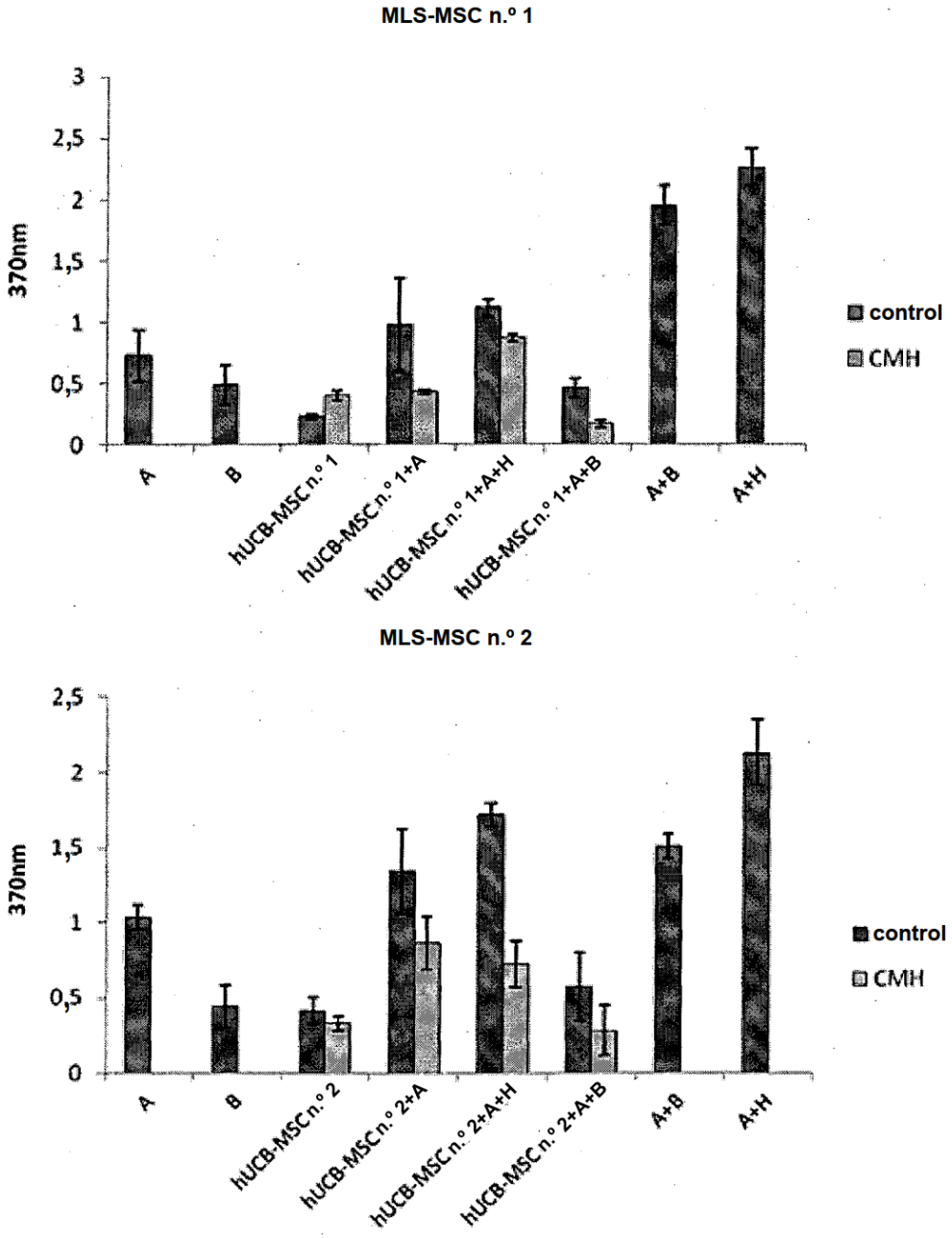

MLS-MSC n.º 1
370nm
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
A
B
hUCB-MSC n.º 1
hUCB-MSC n.º 1+A
hUCB-MSC n.º 1+A+H
hUCB-MSC n.º 1+A+B
A+B
A+H
control
CMH
MLS-MSC n.º 2
370nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
A
B
hUCB-MSC n.º 2
hUCB-MSC n.º 2+A
hUCB-MSC n.º 2+A+H
hUCB-MSC n.º 2+A+B
A+B
A+H
control
CMH

FIG. 11

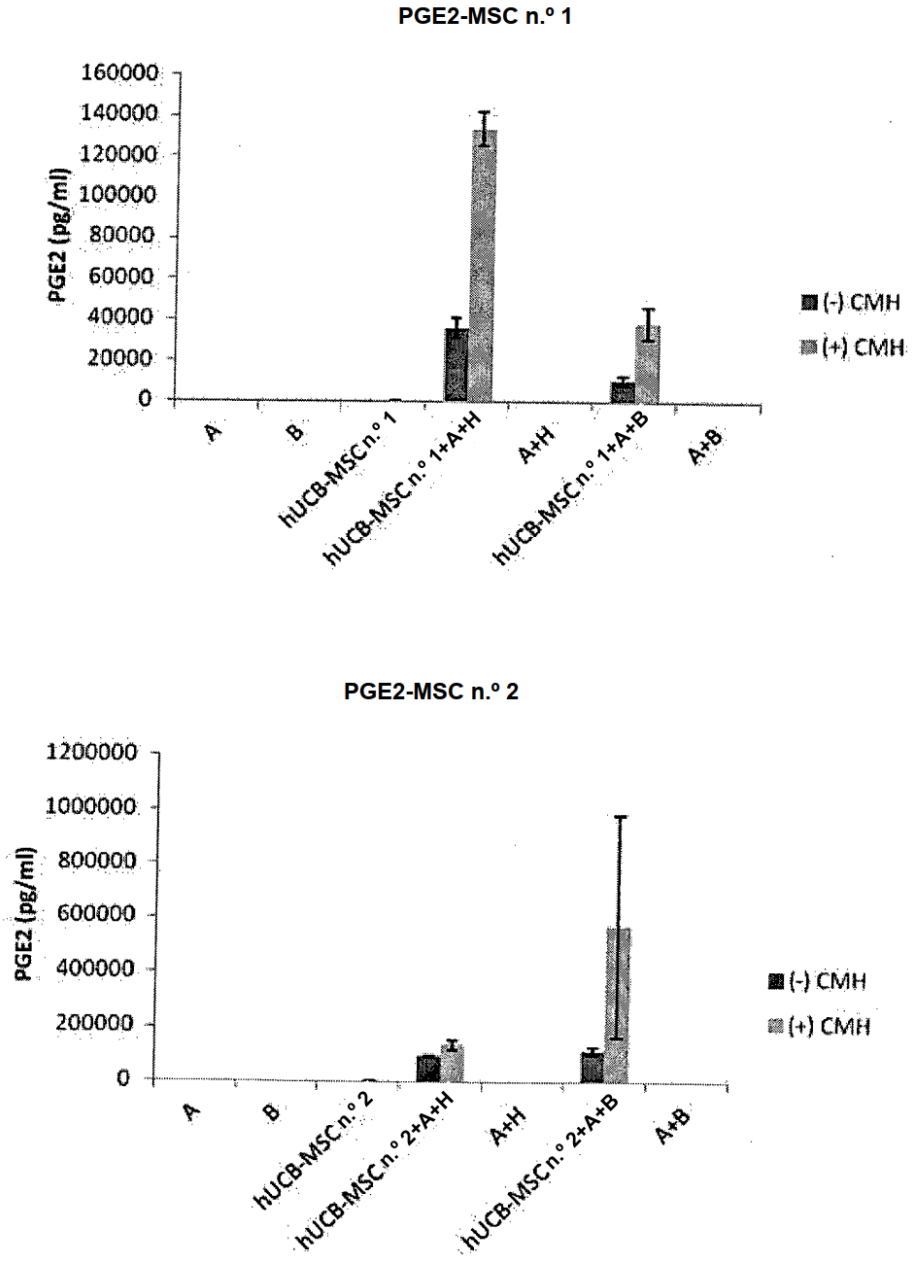
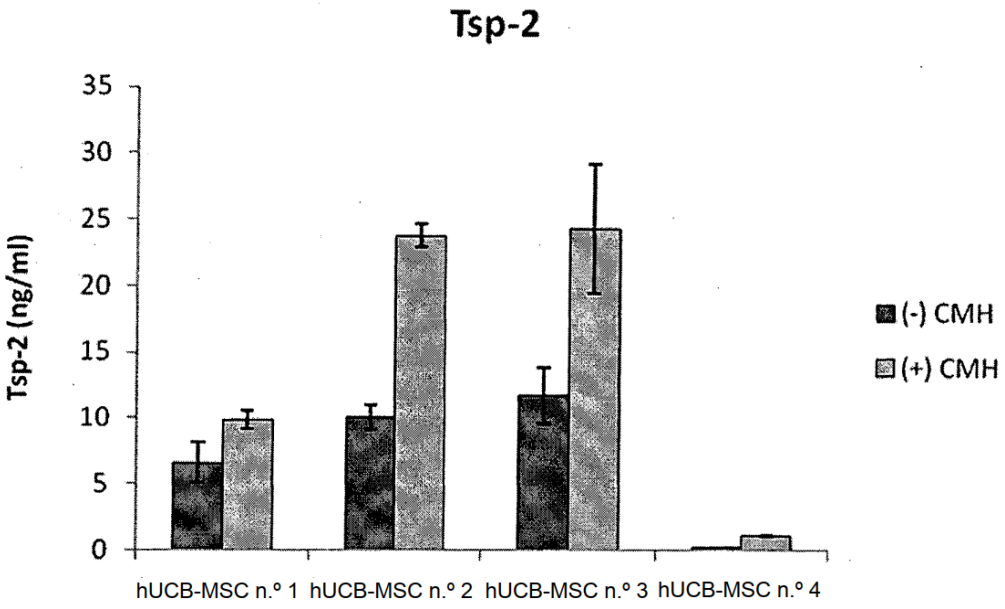

PGE2-MSC n.º 1
PGE2 (pg/ml)
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
A
B
hUCB-MSC n.º 1
hUCB-MSC n.º 1+A+H
A+H
hUCB-MSC n.º 1+A+B
A+B
(-) CMH
(+) CMH
PGE2-MSC n.º 2
PGE2 (pg/ml)
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
A
B
hUCB-MSC n.º 2
hUCB-MSC n.º 2+A+H
A+H
hUCB-MSC n.º 2+A+B
A+B
(-) CMH
(+) CMH

FIG. 12


Tsp-2
Tsp-2 (ng/ml)
35
30
25
20
15
10
5
0
hUCB-MSC n.º 1
hUCB-MSC n.º 2
hUCB-MSC n.º 3
hUCB-MSC n.º 4
(-) CMH
(+) CMH