

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 281**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/24 (2015.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2019 PCT/KR2019/012602**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2020 WO20067774**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2019 E 19867525 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024 EP 3865571**

54 Título: **Células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial y uso de las mismas**

30 Prioridad:

28.09.2018 KR 20180116496

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

21.04.2025

73 Titular/es:

**HIERABIO INC. (100.00%)
305ho, B dong, 52, Ewhayeodae-gil
Seodaemun-gu, Seoul, 03760, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SEUNG JIN;
KIM, HEEJUNG y
YANG, YOUNG-IL**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

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

ES 3 014 281 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

Células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial y uso de las mismas

5

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un método para preparar células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial usando un tejido sinovial y un hidrogel, y a una composición farmacéutica para tratar el daño óseo o cartilaginoso, incluyendo la composición farmacéutica las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial.

15 2. Descripción de la técnica relacionada

Los huesos sostienen los tejidos blandos del cuerpo y el peso corporal, y protegen los órganos internos del impacto externo al encerrarlos. Además, los huesos son una de las partes importantes del cuerpo que no sólo sostienen estructuralmente los músculos u órganos, sino que también almacenan sustancias tales como calcio u otros minerales esenciales, tales como fósforo o magnesio, en el cuerpo.

Existen articulaciones entre los huesos que constituyen el cuerpo. Las articulaciones se pueden clasificar en articulaciones inmóviles con poca o ninguna movilidad entre dos huesos o cartílagos que están en contacto entre sí, tales como el cráneo o la raíz dental, articulaciones móviles con muchos tejidos conjuntivos y alta movilidad entre dos huesos, tales como los huesos de las extremidades o la mandíbula de un animal, y articulaciones anfiartroídicas ligeramente móviles. Las articulaciones generalmente se refieren a las articulaciones móviles, y las articulaciones móviles se clasifican en articulaciones ligamentosas, por lo que ambos huesos están conectados solo con ligamentos y articulaciones sinoviales. La articulación sinovial se refiere a una articulación rodeada por una cápsula de tejido conjuntivo (cápsula articular). El interior de la cápsula articular secreta un líquido sinovial que tiene propiedades lubricantes, y muchos ligamentos se encuentran fuera de la cápsula articular para fortalecer la articulación.

Las células madre, que son las células en la fase de prediferenciación antes de diferenciarse en cada célula que constituye un tejido, se refieren a células que tienen un potencial de proliferación ilimitado en el estado indiferenciado y que tienen un potencial de diferenciación en células de diversos tejidos mediante un estímulo de diferenciación específico.

Las células madre se dividen en gran medida en células madre embrionarias (células madre embrionarias) y células madre adultas (células madre específicas de tejido) según su potencial de diferenciación. Las células madre embrionarias son células madre aisladas de la masa celular interna (ICM), que se supone que se convierte en un feto, en la etapa muy temprana del blastocisto antes de que el óvulo fertilizado se implante en el endometrio. Estas células madre embrionarias son células pluripotentes que pueden diferenciarse en todos los tejidos.

Por el contrario, las células madre específicas de tejido son células madre específicas de cada órgano, que aparecen en la fase de formación del órgano durante el desarrollo embrionario. Su potencial de diferenciación se limita generalmente a las células formadoras de tejido (multipotentes). Las células madre específicas de tejido representativas son las células madre hematopoyéticas que existen en la médula ósea y las células madre mesenquimales que se diferencian en células del tejido conjuntivo, excepto las células sanguíneas. Las células madre hematopoyéticas se diferencian en diversas células sanguíneas, como eritrocitos, leucocitos, etc., y las células madre mesenquimales se diferencian en osteoblastos, condroblastos, adipocitos, mioblastos, etc.

Recientemente, las células madre embrionarias humanas se aislaron con éxito y la aplicación clínica de las mismas ha sido una preocupación importante. El mejor interés de la aplicación de células madre es usar células madre como proveedor de células para la terapia de reemplazo celular.

55 En la diferenciación de las células madre mesenquimales en células condrogénicas y, además, en condrocitos, es decir, en la diferenciación condrogénica, intervienen citocinas y factores de crecimiento. No se han identificado los mecanismos exactos, pero se sabe que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la proteína morfogénica ósea (BMP), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), etc., desempeñan un papel importante en la diferenciación en condrocitos. Por consiguiente, las células madre mesenquimales se estudian para usar su capacidad de diferenciación para la regeneración del tejido articular dañado, el tratamiento de la inflamación o similares (patente estadounidense número 6835377). Además, las células madre derivadas de la médula ósea (Majumdar M. K. y col., J. Cell. Physiol. 185: 98-106, 2000), sangre del cordón umbilical (Gang E. J. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 321: 102-108, 2004) y membrana sinovial (Fickert S. y col., Osteoarthritis Cartilage 11: 790-800, 2003) se estudian como fuente celular disponible para el tratamiento del cartílago dañado además de los condrocitos autólogos del paciente. Sin embargo, el tratamiento de la enfermedad ósea o la

65

inflamación con células madre no es tan eficaz en la actualidad. Especialmente, nunca se ha informado sobre el tratamiento de enfermedades o inflamaciones óseas con células madre del cartílago.

5 La solicitud de patente europea EP 3 028 722 A1 describe MSC sinoviales para la reparación de tejidos. Se describe además el almacenamiento de las MSC sinoviales en ácido hialurónico.

10 La solicitud de patente internacional WO 2008/023829 describe el cultivo ex vivo de células madre mesenquimales autólogas derivadas de la membrana sinovial y la implantación de las MSC de manera que las MSC cubran el sitio del defecto del cartílago y pueda producirse la regeneración.

10 Ferro y col., J. Cell. Physiol., vol. 234, n.º 4, 2018, págs. 3973-3984, describe el aislamiento y el cultivo de MSC derivadas de la membrana sinovial que pueden usarse en la ingeniería de tejidos y la reparación del cartílago.

15 Fan y col., Acta Biomaterialia, vol. 6, n.º 3, 2010, págs. 1178-1186 describen MSC derivadas de la membrana sinovial aisladas de tejido sinovial de conejo, amplificadas hasta el pase 4 en monocapa y encapsuladas en hidrogeles de gelano inyectables. Los geles inyectables, cuando se tratan con TGF-beta1, TGF-beta3 o BMP-2, se consideran competentes para la formación de cartílago mediante ingeniería in vitro.

20 Carrion y col., Tissue Engineering Part C, Methods Dec 2008, vol.20, n.º 3, 2014, págs. 252-263, describen un método para recuperar células encapsuladas en hidrogeles de fibrina 3D basados en la nattoquinasa. El método usa células madre mesenquimales y no tejido sinovial.

25 En vista de estos antecedentes técnicos, los presentes inventores han realizado diversos estudios para desarrollar nuevas células madre que puedan usarse para el tratamiento del daño del cartílago y, como resultado, confirmaron que las células madre mesenquimales derivadas del tejido sinovial pueden tratar eficazmente el daño del cartílago, completando así la presente invención.

Resumen de la invención

30 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Los aspectos adicionales se proporcionan únicamente con fines ilustrativos. Se entiende que cualquier referencia a los métodos de tratamiento debe interpretarse como referencia a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos para su uso en dichos métodos.

35 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial usando un tejido sinovial y un hidrogel tal como se define en las reivindicaciones 1 a 3.

El presente documento también describe células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial preparadas mediante el método anterior.

40 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para tratar el daño óseo o cartilaginoso, incluyendo la composición farmacéutica las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial tal como se definen en las reivindicaciones 4 a 8.

45 El presente documento también describe una composición para cultivar células madre mesenquimales, cuya composición incluye un tejido sinovial y un hidrogel.

Otro aspecto más de la presente descripción es un kit para cultivar células madre mesenquimales, incluyendo el kit incluye la composición.

50 Otro aspecto más de la presente descripción es el uso de las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el daño óseo o cartilaginoso.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1A muestra imágenes microscópicas que muestran los resultados del cultivo de fragmentos sinoviales durante 14 días;

60 La figura 1B muestra imágenes microscópicas que muestran los resultados del subcultivo de SynMSC durante 15 pases, en las que el pase 1 representa el pase de subcultivo 1 (P1), el pase 5 representa el pase de subcultivo 5 (P5) y el pase 15 representa el pase de subcultivo 15 (P15);

La figura 2A muestra imágenes que muestran los resultados de la inmunotinción de epítomos positivos de SynMSC con un anticuerpo monoclonal;

65 La figura 2B muestra imágenes que muestran los resultados de la inmunotinción de epítomos negativos de SynMSC con un anticuerpo monoclonal;

La figura 2C muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de la fluorescencia desarrollada durante la inmunotinción de las synMSC;

5 La figura 3A muestra imágenes microscópicas de fluorescencia que muestran los resultados de realizar la tinción con rojo aceite O, después de inducir la diferenciación de las synMSC en adipocitos;

La figura 3B muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de tinción con rojo aceite O que se midieron en adipocitos diferenciados de las synMSC;

10 La figura 3C muestra imágenes microscópicas de fluorescencia que muestran los resultados de realizar la tinción con rojo de alizarina S, después de inducir la diferenciación de las synMSC en osteocitos;

15 La figura 3D muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de tinción de rojo de alizarina S que se midieron en osteocitos diferenciados de SynMSC;

La figura 3E muestra imágenes microscópicas de fluorescencia que muestran los niveles de desarrollo del color de BCIP/NBT según la actividad de la ALP, después de inducir la diferenciación de las synMSC en osteocitos;

20 La figura 3F muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de la actividad de la ALP que se midió en los osteocitos diferenciados de las synMSC;

La figura 4A muestra imágenes microscópicas que muestran los resultados de la tinción con H&E y la tinción con azul alcian de los grupos de control, BMSC y P3 SynMSC;

25 La figura 4B muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de tinción con H&E de las BMSC y P3 SynMSC;

30 La figura 4C muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de tinción con azul alcian de BMSC y P3 SynMSC;

35 La figura 5A muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de sGAG (glucosaminoglicanos sulfatados) que se midieron en las synMSC P3 (grupo de control), los condrocitos (grupo comparativo) diferenciados de las synMSC P3 y los condrocitos (grupo experimental) diferenciados de las synMSC P3 usando BMP-7;

40 La figura 5B muestra una imagen de electroforesis que muestra los resultados de la medición de los niveles de expresión de proteínas marcadoras condrogénicas (SOX-9, agregano y colágeno de tipo 2) que se expresaron en P3 SynMSC (grupo de control), condrocitos (grupo comparativo) diferenciados de SynMSC P3 y condrocitos (grupo experimental) diferenciados de SynMSC P3 usando BMP-7;

45 La figura 5C muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de expresión de las proteínas marcadoras condrogénicas (SOX-9, agregano y colágeno de tipo 2) que se expresaron en las synMSC P3 (grupo de control), los condrocitos (grupo comparativo) diferenciados de las synMSC P3 y los condrocitos (grupo experimental) diferenciados de las synMSC P3 usando BMP-7;

La figura 6A muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis de los cambios en el número de células viables, después de cultivar las synMSC P3 usando un andamiaje de PLGA;

50 La figura 6B muestra una imagen microscópica electrónica de barrido que muestra los cambios morfológicos durante el período de cultivo, cuando las synMSC P3 se cultivaron usando un andamiaje de PLGA; y

55 La figura 7 muestra imágenes microscópicas que muestran los resultados de la tinción con H&E, tinción con safranina-O e inmunotinción con anticuerpos contra el colágeno de tipo 2 de fémures de articulaciones de conejo en los que se implantó un andamiaje de PLGA, un cultivo de synMSC sobre un andamiaje de PLGA (PLGA/synMSC) o un cultivo de synMSC sobre un andamiaje de PLGA cargado con BMP-7 (PLGA/synMSC/BMP-7).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

60 Para lograr los objetivos descritos anteriormente, un aspecto de la presente invención definido en las reivindicaciones 1 a 3 proporciona un método para preparar células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial utilizando un tejido sinovial y un hidrogel. El método de preparación de células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial incluye las etapas de (a) encapsular el tejido sinovial en el hidrogel y cultivar el mismo para obtener un cultivo; y (b) degradar el hidrogel en el cultivo obtenido para recuperar, del tejido sinovial, las células madre mesenquimales que migran y proliferan en el hidrogel, en el que las células madre mesenquimales derivadas de la

65

membrana sinovial tienen características inmunológicas de sobreexpresar CD29, CD44, CD73 y CD90 en la superficie celular del mismo.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “membrana sinovial”, que también se denomina membrana sinovial o estrato sinovial, se refiere a un tejido conjuntivo laxo que constituye la capa interna de las cápsulas articulares que rodean la cavidad articular. Se sabe que los vasos sanguíneos capilares se desarrollan en la membrana sinovial para intercambiar activamente el líquido sinovial. La membrana sinovial tiene un volumen diferente según la articulación y, en algunos casos, forma arrugas que rodean la almohadilla de grasa en la cavidad articular y llena la cavidad de la articulación.

10 En la presente invención, la membrana sinovial puede entenderse como un tejido fuente para aislar las células madre mesenquimales.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “hidrogel” se refiere a un gel que contiene agua como medio de dispersión. El hidrogel se forma principalmente cuando se pierde fluidez debido al enfriamiento o cuando un polímero hidrófilo que tiene una estructura de red tridimensional y una estructura microcristalina contiene agua para hincharse. Dado que un hidrogel que contiene electrolitos poliméricos presenta una alta absorción de agua, se ha usado prácticamente como polímero absorbente de agua en una variedad de campos.

20 En la presente invención, el polímero hidrófilo que constituye el hidrogel no está particularmente limitado, siempre que se use en el proceso de preparación de las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial, y puede ser, por ejemplo, colágeno, gelatina, condroitina, ácido hialurónico, ácido alginico, Matrigel™, quitosano, péptido, fibrina, ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), polietilenglicol (PEG), poli(acrilamida), etc., y una mezcla de los mismos.

25 En la etapa (a) del método de preparación de células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial proporcionado en la presente invención, el método para encapsular el tejido sinovial en el hidrogel no está particularmente limitado, sino que puede realizarse mediante un método para mezclar el tejido sinovial con el polímero hidrófilo que constituye el hidrogel y, a continuación, transformar el polímero hidrófilo en el hidrogel; o un método para formar el hidrogel y luego inyectar físicamente el tejido sinovial dentro del hidrogel, etc.

30 En la etapa (a), el cultivo del hidrogel, en el que se encapsula el tejido sinovial, se puede realizar después de sumergir el hidrogel, en el que se encapsula el tejido sinovial, en un medio común que se sabe en la técnica que es adecuado para cultivar células madre.

35 El medio no está particularmente limitado, pero por un ejemplo, se puede usar el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) o el medio exento de suero de queratinocitos (queratinocito-SFM) y, por otro ejemplo, se puede usar el medio D (Gibco).

40 El medio puede incluir además diversos tipos de aditivos y se puede usar, por ejemplo, un tampón neutro (por ejemplo, fosfato y/o bicarbonato de alta concentración) en solución isotónica, un nutriente proteico (por ejemplo, suero como FBS, reemplazo sérico, albúmina o aminoácidos esenciales y no esenciales como la glutamina), lípidos (ácidos grasos, colesterol, un extracto de suero de HDL o LDL) y otros componentes (por ejemplo, insulina o transferrina, nucleósidos o nucleótidos, piruvato, una fuente de azúcar como la glucosa, selenio en cualquier forma ionizada o sal, un glucocorticoide como hidrocortisona y/o un agente reductor, como el β-mercaptoetanol) como aditivo. Además, para evitar que las células se adhieran entre sí, se puede usar un agente antiaglutinante como aditivo.

45 Además, en la etapa (b) del método de preparación de células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial proporcionado en la presente invención, la degradación del hidrogel no está particularmente limitada, siempre que sea capaz de degradar el hidrogel sin afectar a las células madre del hidrogel. La degradación del hidrogel puede realizarse, por ejemplo, mediante un método de uso de una reacción enzimática y, por otro ejemplo, un método de uso de una enzima que escinde la unión del polímero hidrófilo que constituye el hidrogel, tal como colagenasa, gelatinasa, uroquinasa, estreptoquinasa, un activador del plasminógeno tisular (TPA), plasmina, hialuronidasa, etc.

50 Mientras tanto, las células madre mesenquimales preparadas mediante el método anterior de preparación de células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial muestran características inmunológicas para expresar CD29, CD44, CD73 y CD90 en la superficie celular de las mismas, y características para diferenciarse en células seleccionadas del grupo que consiste en adipocitos, osteocitos, condrocitos y combinaciones de los mismos.

60 En particular, cuando las células madre mesenquimales se diferencian en condrocitos mediante el tratamiento con BMP-7, la eficacia de la diferenciación en condrocitos puede aumentar notablemente.

Además, la proliferación de las células madre mesenquimales puede promoverse mediante el uso de un andamiaje de PLGA.

Otro aspecto de la presente invención definido en las reivindicaciones 4 a 8 proporciona una composición farmacéutica para tratar el daño óseo o cartilaginosa, incluyendo la composición farmacéutica, como ingrediente activo, las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial preparadas mediante el método de la invención.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” significa todas las acciones mediante las cuales los síntomas del daño óseo o cartilaginosa han mejorado o se han modificado favorablemente mediante la administración de las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial, su cultivo o las células diferenciadas de las células madre mesenquimales.

10 Según una realización a modo de ejemplo de la presente invención, se confirmó que cuando las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial se inyectaron en el sitio dañado del cartílago y el fémur de la articulación de la rodilla, mostraron un efecto terapéutico de regeneración del hueso y el cartílago dañados, y este efecto terapéutico se mejoró con la BMP-7.

15 En la presente invención, las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial pueden mostrar un efecto terapéutico en el sitio dañado del hueso o cartílago, y este efecto terapéutico puede mejorarse cuando las células madre mesenquimales se usan en forma de mezcla con un soporte. Específicamente, cuando las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial se usan después de cultivarse en forma de adheridas al soporte, se puede mejorar el efecto terapéutico. Cuando se usa el soporte, cuya superficie está cargada con BMP-7,
20 el efecto terapéutico puede mejorarse aún más.

En la presente invención, el soporte no está particularmente limitado, siempre que no perjudique el efecto terapéutico de las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial, y el soporte puede ser, por ejemplo, un andamiaje de PLGA.

25 El nivel de células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial incluidas en la composición farmacéutica proporcionada en la presente invención no está particularmente limitado, y la composición farmacéutica puede incluir, por ejemplo, de $1,0 \times 10^5$ células a $1,0 \times 10^9$ células por 1 ml, para otro ejemplo, de $1,0 \times 10^6$ células a $1,0 \times 10^8$ células por 1 ml, y para todavía otro ejemplo, de $1,0 \times 10^7$ células por 1 ml.

30 La composición farmacéutica se puede usar sin congelar o se puede congelar para su uso posterior. Si se requiere congelar la composición farmacéutica, se puede añadir un crioprotector estándar (por ejemplo, DMSO, glicerol, medio de congelación celular Eplife® (Cascade Biologics)) a la población de células antes de congelarla.

35 Además, la composición farmacéutica se puede administrar después de formularla en una dosis unitaria adecuada para administrar a un paciente mediante métodos comunes en el campo farmacéutico, en los que la formulación contiene una cantidad eficaz para una dosis única o para dosis divididas. Para este propósito, una formulación para administración parenteral incluye preferiblemente una formulación para inyección, tal como una ampolla para inyección, una formulación para infusión, tal como una bolsa de infusión, y una formulación para aerosol, tal como un aerosol. La ampolla para inyección se puede mezclar con una solución para inyección inmediatamente antes de la
40 administración y, como solución para inyección, se puede usar una solución salina, una solución de glucosa, manitol o ringer, etc. Además, la bolsa de infusión puede estar texturizada con cloruro de polivinilo o polietileno, y puede ejemplificarse con un producto de Baxter, Becton Dickinson, Medcep, National Hospital Products o Terumo.

45 La composición farmacéutica puede incluir además uno o más portadores inactivos comunes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, un conservante, un controlador analgésico, un solubilizante, un estabilizador, etc. para la formulación inyectable, y una base, un excipiente, un lubricante, un conservante, etc. para la formulación tópica, además de las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial.

50 Además, la composición farmacéutica proporcionada en la presente invención puede incluir diversos componentes que pueden ayudar en el tratamiento del daño óseo o cartilaginosa, pueden mantener la actividad de las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial o pueden promover la diferenciación de las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial, además de las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial. La composición farmacéutica puede incluir además, por ejemplo, un agente antiinflamatorio, un
55 factor movilizador de células madre, un factor inductor del crecimiento, etc.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar de acuerdo con cualquier método común en la técnica, junto con otras células madre utilizadas para el trasplante y otros fines, en forma de una mezcla con las mismas. Se prefiere el injerto directo o el trasplante en la lesión de un paciente que necesita tratamiento, o el trasplante o la inyección directos en la cavidad peritoneal, pero no se limita a ello. Además, es posible tanto una administración no quirúrgica con un catéter como una administración quirúrgica, tal como una inyección o un trasplante después de la incisión, pero se prefiere más la administración no quirúrgica con un catéter. Además, la composición también se puede administrar por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, que es uno de los métodos comunes para el trasplante de células madre del sistema hematopoyético, además de la administración directa a la
60 lesión.
65

5 La dosificación diaria de las células madre no está particularmente limitada, pero las células madre se pueden administrar, por ejemplo, en una cantidad de $1,0 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^{10}$ células/kg (peso corporal) y, para otro ejemplo, de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^9$ células/kg (peso corporal) por día en una dosis única o en dosis divididas. Sin embargo, debe entenderse que la cantidad del ingrediente activo realmente administrada debe determinarse a la luz de varios factores relevantes que incluyen la enfermedad a tratar, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración y el peso corporal, la edad y el sexo del paciente, etc., y por tanto, la dosis de administración anterior no debe limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

10 Otro aspecto más de la presente descripción es una composición para cultivar células madre mesenquimales, en la que la composición incluye un tejido sinovial y un hidrogel, y un kit para cultivar las células madre mesenquimales, en el que el kit incluye la composición.

15 Tal como se describió anteriormente, cuando el tejido sinovial se cultiva después de encapsularse en el hidrogel, las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial pueden prepararse eficazmente y, por tanto, la composición que incluye el tejido sinovial y el hidrogel puede usarse como una composición para cultivar las células madre mesenquimales.

20 Además, el kit para cultivar las células madre mesenquimales puede incluir la composición para cultivar las células madre mesenquimales y diversos componentes, tales como una solución y un dispositivo, necesarios para cultivar las células madre mesenquimales.

25 Los componentes pueden ejemplificarse mediante, pero no se limitan particularmente a, un tubo de ensayo, un recipiente apropiado, un tampón de reacción (varía en el pH y la concentración del tampón), un recipiente de cultivo, un medio de cultivo, agua estéril, etc.

Otro aspecto más de la presente descripción es el uso de las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial para la preparación de la composición farmacéutica para tratar el daño óseo o cartilaginoso.

30 Las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial para la preparación de la composición farmacéutica se pueden mezclar con un excipiente, diluyente, portador, etc. aceptable, y se pueden formular en una preparación compleja con otros agentes activos para tener un efecto sinérgico de los principios activos.

35 Los mencionados en la composición, el uso y el método de tratamiento descritos en el presente documento son los mismos siempre que no se contradigan entre sí.

A continuación en la memoria, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos son sólo para ilustrar la presente invención, y el alcance de la presente invención no pretende estar limitado por los siguientes ejemplos.

40 Ejemplo 1: Adquisición de células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial

45 La membrana sinovial se obtuvo de la bolsa suprapatelar de ambas articulaciones de la rodilla de un conejo (conejo blanco de Nueva Zelanda, de 6 a 48 semanas de edad, macho). La membrana sinovial obtenida se cortó finamente para obtener fragmentos sinoviales, que luego se lavaron con PBS. Los fragmentos sinoviales lavados se suspendieron en un medio DMEM, en el que estaban contenidos 100 ug/ml de ácido aminometilbenzoico y se disolvió 1 unidad/ml de trombina, y este se mezcló con un medio DMEM, en el que estaban contenidos 40 mmol/l de cloruro de calcio y se disolvió fibrinógeno al 0,5 %, a 1:1 (v/v) para formar un hidrogel. Se introdujeron 10 ml del hidrogel que contenía unos 200 mg de fragmentos sinoviales en un recipiente de cultivo de 100 mm y se incubaron en una cámara de humidificación a 37 °C durante 2 horas; a continuación, se introdujeron 10 ml de un medio de crecimiento primario (DMEM-Ham F12 al 90 %, suero bovino fetal al 10 %, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 2 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), 10 ng/ml de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y 10 ug/ml de gentamicina), y a continuación se incubaron a 37 °C durante 14 días en la cámara de humidificación. Una vez completado el cultivo, se retiró el medio y la fibrina que formaba el hidrogel se degradó añadiendo un medio DMEM que contenía 5000 unidades de uroquinasa y un 30 % de suero de ternera, y luego se centrifugó (150 g, 5 minutos) para obtener células madre mesenquimales (SynMSC) derivadas de la membrana sinovial (figura 1A).

55 La figura 1A muestra imágenes microscópicas que muestran los resultados del cultivo de fragmentos sinoviales durante 14 días.

60 Las synMSC obtenidas se lavaron con PBS dos veces y se suspendieron en un medio de crecimiento secundario (FBS al 10 % v/v con 10 U/ml de antibióticos, 10 ng/ml de EGF y 2 ng/ml de bFGF en la mezcla F-12 (1,1) de DMEM/Ham), y después se subcultivaron durante 7 días. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 % al 90 %, se terminó el cultivo. A continuación, el cultivo se trató con una solución de tripsina-EDTA al 2,5 % (p/v) para separar las células y, a continuación, se centrifugó para obtener el pase 1 (P1) de SynMSC. Posteriormente, se repitió el mismo método para obtener cinco series diferentes del pase 15 (P15) de SynMSC (figura 1B).

La figura 1B muestra imágenes microscópicas que muestran los resultados del subcultivo de SynMSC durante 15 pases, en los que el pase 1 representa el pase de subcultivo 1 (P1), el pase 5 representa el pase de subcultivo 5 (P5) y el pase 15 representa el pase de subcultivo 15 (P15).

- 5 Tal como se muestra en la figura 1B, se observó que las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial (SynMSC) mantenían las características morfológicas incluso después de subcultivarse 15 veces.

Ejemplo 2: Inmunofenotipado de SynMSC

- 10 Entre los diversos pases de SynMSC obtenidos en el ejemplo 1, el pase 3 (P3) de SynMSC se sometió a un perfil de epítomos de la superficie celular. En este momento, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73 y CD90 se seleccionaron como epítomos.

- 15 En resumen, se dispensaron 1×10^4 P3 SynMSC por pocillo y se cultivaron en una placa de 96 pocillos y, una vez completado el cultivo, se añadió PBST que contenía BSA al 1 % (PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %) para realizar el bloqueo. A continuación, se añadió cada anticuerpo monoclonal contra el epítomo (anti-CD29 de ratón, anti-CD44 de conejo, anti-CD73 PE-cianina7 humano, anti-CD90 PE-CyTM7 humano, anti-CD34 perCPCy5.5 y anti-CD45 de conejo) y se dejó reaccionar. Una vez completada la reacción, las células se lavaron tres veces con PBS, BSA al 1 % y se añadió un anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488, 1:100) y, a continuación, se hizo reaccionar adicionalmente en la oscuridad. Una vez completada la reacción, las células se volvieron a lavar tres veces con PBS, se añadió DAPI (Molecular probes, OR, EE. UU.) y, a continuación, se realizó una contratinción en una habitación oscura a temperatura ambiente. Una vez completada la tinción, se realizó el escaneo usando Operetta®; El sistema de obtención de imágenes de alto contenido (PerkinElmer, MA, EE. UU.) y la intensidad de la fluorescencia se analizaron cuantitativamente (figuras 2A a 2C). En este momento, como grupo de control, se usaron los tratados con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488 (H+L) en lugar del anticuerpo monoclonal contra el epítomo.

- 30 La figura 2A muestra imágenes que muestran los resultados de la inmunotinción de epítomos positivos de las synMSC con el anticuerpo monoclonal, la figura 2B muestra las imágenes que muestran los resultados de la inmunotinción de epítomos negativos de las synMSC con el anticuerpo monoclonal, y la figura 2C muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de la fluorescencia desarrollado durante la inmunotinción de las synMSC.

- 35 Tal como se muestra en las figuras 2A a 2C, se confirmó que CD29, CD44, CD73 y CD90 se expresaron, pero CD34 y CD45 no se expresaron en la superficie celular de las synMSC.

Ejemplo 3: Análisis del potencial de diferenciación de las synMSC

Ejemplo 3-1: Diferenciación en adipocitos

- 40 Se dispensaron 1×10^4 P3 SynMSC por pocillo en cada pocillo de una placa de 48 pocillos que contenía un medio de inducción de la diferenciación adipogénica (isobutilmethylxantina 0,5 mM, dexametasona 1 μ M, insulina 10 μ M, indometacina 200 μ M, antibiótico al 1 % en DMEM) y se cultivaron en una monocapa durante 8 días para inducir la diferenciación en adipocitos. Como grupo de control, se usaron los cultivados en un medio básico (FBS al 10 % en DMEM). Una vez completado el cultivo, las células se fijaron mediante tratamiento con paraformaldehído al 4 % y se realizó una tinción con rojo aceite O para detectar las gotitas de lípidos intracelulares que son una característica de los adipocitos, y luego se observaron usando un microscopio de fluorescencia (figura 3A). Posteriormente, para analizar cuantitativamente el contenido del colorante, se añadió isopropanol a las células teñidas para extraer el colorante y se midió la absorbancia a 540 nm (figura 3B).

- 50 La figura 3A muestra imágenes microscópicas de fluorescencia que muestran los resultados de la tinción con rojo aceite O, después de inducir la diferenciación de las synMSC en adipocitos, y la figura 3B muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de tinción con rojo aceite O que se midieron en adipocitos diferenciados de las synMSC.

- 55 Tal como se muestra en las figuras 3A y 3B, cuando se indujo la diferenciación de las synMSC en adipocitos, se detectaron gotitas de lípidos en las células después de 8 días, lo que se demostró mediante la tinción con rojo aceite O.

Por tanto, se descubrió que las synMSC presentaban el potencial de diferenciación en adipocitos.

60

Ejemplo 3-2: Diferenciación en osteocitos

- 65 Se dispensaron 1×10^4 P3 SynMSC por pocillo en cada pocillo de una placa de 48 pocillos que contenía un medio de inducción de la diferenciación osteogénica (dexametasona 100 nM, 50 μ g/ml de ascorbato-2-fosfato, bet-glicerofosfato 10 mM, antibiótico al 1 % suspendido en DMEM) y se cultivaron durante 14 días para inducir la diferenciación en osteocitos. Como grupo de control, se usaron los cultivados en un medio básico (FBS al 10 % en DMEM). Una vez

completado el cultivo, las células se fijaron mediante tratamiento con paraformaldehído al 4 %, y se añadió BCIP/NBT (Sigma Aldrich, MO, EE. UU.), que es un sustrato de la fosfatasa alcalina (ALP), y se dejó reaccionar. Una vez completada la reacción, se realizó la tinción con rojo de alizarina S para detectar los depósitos de calcio que son una característica de los osteocitos, y luego se observaron usando un microscopio de fluorescencia, y se analizaron cuantitativamente los niveles de tinción de los mismos (figuras 3C y 3D).

La figura 3C muestra imágenes microscópicas de fluorescencia que muestran los resultados de la tinción con rojo de alizarina S, después de inducir la diferenciación de las synMSC en osteocitos, y la figura 3D muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de tinción con rojo de alizarina S que se midieron en osteocitos diferenciados de las synMSC.

Tal como se muestra en las figuras 3C y 3D, cuando se indujo la diferenciación de las synMSC en osteocitos, se detectaron depósitos de calcio en las células después de 14 días, lo que se demostró mediante la tinción con rojo de alizarina S.

La figura 3E muestra imágenes microscópicas de fluorescencia que muestran los niveles de desarrollo del color del BCIP/NBT según la actividad de la ALP, después de inducir la diferenciación de las synMSC en osteocitos, y la figura 3F muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de la actividad de la ALP que se midió en los osteocitos diferenciados de las synMSC.

Tal como se muestra en las figuras 3E y 3F, se confirmó que cuando se indujo la diferenciación de las synMSC en osteocitos, la actividad de la ALP, que se conoce como marcador de diferenciación ósea, aumentó aproximadamente 3 veces después de 14 días.

Por tanto, se descubrió que las synMSC presentaban el potencial de diferenciación en osteocitos.

Ejemplo 3-3: Diferenciación en condrocitos

Se dispensaron 1×10^6 P3 SynMSC por pocillo en cada pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos recubierta con poli-D-lisina que contenía un medio de inducción de la diferenciación condrogénica (suero de ternera al 1 %, $1 \times$ ITS, dexametasona 0,1 mM, 50 ug/ml de ascorbato-2-fosfato suspendido en DMEM) y se cultivaron durante 2 semanas para inducir la diferenciación en condrocitos. El segundo día de cultivo, se formaron esferoides a partir de P3 SynMSC y el medio se reemplazó cada dos días. Una vez completado el cultivo, se obtuvieron esferoides como productos de cultivo y se fijaron mediante tratamiento con paraformaldehído al 4 % durante 2 horas. Posteriormente, se realizó una centrifugación (300 g, 5 min) para obtener esferoides, que luego se lavaron con PBS tres veces, y luego los esferoides se deshidrataron mediante un tratamiento secuencial con concentraciones crecientes de soluciones de etanol del 50 % al 100 %. Luego, los esferoides se embebieron en parafina y se obtuvieron secciones de 4 μ m de grosor, seguidas de tinción con H&E y tinción con azul alción. Las regiones nucleares se tiñeron de contraste con rojo rápido nuclear (figuras 4A a 4C). En este momento, como grupo de control, se usó un producto resultante de la inducción de la diferenciación de células madre derivadas de la médula ósea (BMSC) en las mismas condiciones.

La figura 4A muestra imágenes microscópicas que muestran los resultados de la tinción con H&E y la tinción con azul alción de grupos de control, BMSC y P3 SynMSC, la figura 4B muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de tinción con H&E de BMSC y P3 SynMSC, y la figura 4C muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de tinción con azul alción de las BMSC y P3. Sincronización MP3.

Tal como se muestra en las figuras 4A a 4C, se confirmó que cuando se indujo la diferenciación en condrocitos en las mismas condiciones, el nivel de condrocitos diferenciados de las synMSC P3 era significativamente mayor que el de los condrocitos diferenciados de las BMSC del grupo de control. En particular, el resultado de la tinción con H&E mostró que los condrocitos diferenciados de las synMSC P3 mostraron un nivel aproximadamente 9 veces mayor que los condrocitos diferenciados de las BMSC, y el resultado de la tinción con azul alción mostró que los condrocitos diferenciados de las synMSC P3 mostraron un nivel aproximadamente 13 veces mayor que los condrocitos diferenciados de las BMSC.

Por tanto, se descubrió que las synMSC presentaban el potencial de diferenciación en condrocitos.

Ejemplo 3-4: Efecto de BMP-7 sobre la diferenciación en condrocitos

Ejemplo 3-4-1: Inducción de la diferenciación de las synMSC en condrocitos mediante BMP-7

La diferenciación de los condrocitos de las P3 SynMSC se indujo de la misma manera que en el ejemplo 3-3, excepto que se usó un medio de inducción de la diferenciación condrogénica complementado con BMP-7 (50 ng/ml). En este momento, se usó un cultivo, obtenido usando un medio basal (FBS al 10 % en DMEM) en lugar del medio de inducción de la diferenciación condrogénica, como grupo de control, y un cultivo, obtenido induciendo la diferenciación de condrocitos de las sinMSC P3 de la misma manera que en el ejemplo 3-3, se usó como grupo comparativo.

Ejemplo 3-4-2: Análisis del contenido de glicosaminoglicanos sulfatados (sGAG)

5 Los glicosaminoglicanos sulfatados (sGAG) se analizaron cuantitativamente para el grupo de control, el grupo comparativo y el grupo experimental obtenidos en el ejemplo 3-4-1.

10 En resumen, se añadió colorante Blyscan al extracto celular de cada muestra, se hizo reaccionar durante 30 minutos en condiciones de agitación y, a continuación, se centrifugó (12.000 rpm, 10 minutos) para obtener un precipitado. Se añadió un reactivo de disociación al precipitado obtenido para obtener una suspensión y se midió la absorbancia a 656 nm (figura 5A).

15 La figura 5A muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de sGAG (glucosaminoglicanos sulfatados) que se midieron en las synMSC P3 (grupo de control), los condrocitos (grupo comparativo) diferenciados de las synMSC P3 y los condrocitos (grupo experimental) diferenciados de las synMSC P3 usando BMP-7.

20 Tal como se muestra en la figura 5A, se confirmó que se detectó un nivel significativamente alto de sGAG en los condrocitos (grupo experimental) diferenciados de las synMSC P3 usando BMP-7, en comparación con los condrocitos (grupo comparativo) diferenciados de las synMSC P3.

Ejemplo 3-4-3: Análisis de los niveles de expresión de los marcadores condrogénicos

25 Los niveles de expresión de las proteínas marcadoras condrogénicas (SOX-9, agrecano y colágeno de tipo 2) se analizaron mediante RT-PCR para el grupo de control, el grupo comparativo y el grupo experimental obtenidos en el ejemplo 3-4-1.

30 En resumen, las células de cada muestra se rompieron y el ARN total se extrajo usando el reactivo Trizol (Invitrogen, CA), respectivamente. Cada ARN total extraído se aplicó a un kit de RT-PCR de un solo paso TopScript™ (Enzynomics, Daejeon, Corea) para sintetizar cada ADNc. La PCR se realizó usando cada uno de los ADNc sintetizados como plantilla y los siguientes cebadores para obtener los respectivos productos de amplificación, y los niveles de los mismos se analizaron cuantitativamente (figuras 5B y 5C). En este momento, el GAPDH se usó como grupo de control interno.

SOX-9 F: 5'-CCCGATCTGAAGAAGGAGAGC-3'(SEQ ID NO: 1)

35 SOX-9 R: 5'-GTTCTTCACCGACTTCTCCG-3'(SEQ ID NO: 2)

agrecano F: 5'-TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC-3'(SEQ ID NO: 3)

40 agrecano R: 5'-GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA-3'(SEQ ID NO: 4)

T2 colágeno F: 5'-TTCAGCTATGGAGATGACAATC-3'(SEQ ID NO: 5)

T2 colágeno R: 5'-AGAGTCCTAGAGTGAAGTACTGAG-3'(SEQ ID NO: 6)

45 GAPDH F: 5'-ATTGTTGCCATCAATGACCC-3'(SEQ ID NO: 7)

GAPDH R: 5'-AGTAGAGGCAGGGATGATGTT-3'(SEQ ID NO: 8)

50 La figura 5B muestra una imagen de electroforesis que muestra los resultados de la medición de los niveles de expresión de proteínas marcadoras condrogénicas (SOX-9, agrecano y colágeno de tipo 2) que se expresaron en P3 SynMSC (grupo de control), condrocitos (grupo comparativo) diferenciados de SynMSC P3 y condrocitos (grupo experimental) diferenciados de SynMSC P3 usando BMP-7, y la figura 5B. C muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de los niveles de expresión de las proteínas marcadoras condrogénicas (SOX-9, agrecano y colágeno de tipo 2) que se expresaron en las synMSC P3 (control). grupo), condrocitos (grupo comparativo) diferenciados de SynMSC P3 y condrocitos (grupo experimental) diferenciados de SynMSC P3 usando BMP-7.

60 Tal como se muestra en las figuras 5B y 5C, se confirmó que se detectaron niveles significativamente altos de proteínas marcadoras condrogénicas (SOX-9, agrecano y colágeno de tipo 2) en los condrocitos (grupo experimental) diferenciados de las synMSC P3 usando BMP-7, en comparación con los condrocitos (grupo comparativo) diferenciados de las synMSC P3.

Ejemplo 4: Efecto del andamiaje de PLGA sobre la proliferación celular

Ejemplo 4-1: Preparación del andamiaje de PLGA

65

Se colocó una solución de polímero al 20 % (p/v) obtenida disolviendo PLGA en diclorometano (DCM) en una jeringa de 10 ml con una aguja de calibre 17 y se hiló en húmedo, y luego se obtuvieron fibras de PLGA usando un rodillo. Las fibras de PLGA obtenidas se secaron durante 48 horas y después se secaron a vacío a -70 °C durante 3 días para eliminar el disolvente residual.

Se formó un andamiaje de PLGA tridimensional utilizando la fibra de PLGA obtenida, se sumergió en PBS 1,0 M (pH 7,4) y se agitó a 37 °C a 60 rpm para eliminar los subproductos ácidos resultantes de la degradación del PLGA. El andamiaje de PLGA, del que se retiraron los subproductos ácidos, se lavó con PBS tres veces y se secó al vacío durante 48 horas para preparar un andamiaje tridimensional para el cultivo de P3 SynMSC.

Ejemplo 4-2: Efecto del andamiaje de PLGA

El andamiaje de PLGA preparado en el ejemplo 4-1 se humedeció con etanol y se inocularon 1×10^6 P3 SynMSC por armazón, se lavaron con PBS dos veces y se cultivaron durante 7 días en un medio de crecimiento secundario. Una vez completado el cultivo, se analizó el número de células viables usando un ensayo CCK-8 colorimétrico (Dojindo Molecular Technologies Inc., MD, EE. UU.) y la morfología se analizó con un microscopio electrónico de barrido (SEM) (figuras 6A y 6B). En este momento, las synMSC P3 que se cultivaron en una placa de 24 pocillos en las mismas condiciones se usaron como grupo de control.

La figura 6A muestra un gráfico que muestra los resultados del análisis de los cambios en el número de células viables, después de cultivar las synMSC P3 usando el andamiaje de PLGA, y la figura 6B muestra una imagen microscópica electrónica de barrido que muestra los cambios morfológicos durante el período de cultivo, cuando las synMSC de P3 se cultivaron usando el andamiaje de PLGA.

Tal como se muestra en las figuras 6A y 6B, cuando se usó el armazón de PLGA en lugar de la placa de 24 pocillos, se confirmó que la eficiencia de cultivo de P3 SynMSC aumentó. Esto se debe a que la velocidad de adhesión de las P3 SynMSC al andamiaje de PLGA aumentó con el tiempo y, como resultado, aumentó la tasa de proliferación.

Ejemplo 4-3: Preparación del andamiaje de PLGA cargado con BMP-7

La proteína humana recombinante BMP-7 (3 ug) se disolvió en 10 μ l de PBS y, a continuación, se emulsionó con 0,2 % (p/v) de PLGA en disolvente acetona/etanol (9:1) para obtener una suspensión de agua en aceite de BMP-7 (razón 1:100 w/o), que se colocó en una jeringa de 10 ml con una aguja de calibre 17, y se hizo girar sobre fibras de PLGA mediante electropulverización (tensión de 10 kV, velocidad de flujo de 0,033 ml/min), preparando así un andamiaje de PLGA en el que se cargó BMP-7 encapsulada en las fibras de PLGA.

Ejemplo 5: Tratamiento del daño del cartílago usando synMSC

El andamiaje de PLGA preparado en el ejemplo 4-1, el cultivo de synMSC en el andamiaje de PLGA (PLGA/synMSC), preparado en el ejemplo 4-2, y el cultivo de synMSC en el andamiaje de PLGA cargado con BMP-7 (PLGA/synMSC/BMP-7), preparado en el ejemplo 4-3, se prepararon, respectivamente, y se usaron para preparar cada implante con un grosor de 1 mm y una longitud de 10 mm.

Mientras tanto, se inyectó xilazina (5 mg/kg) por vía intramuscular en conejos blancos neozelandeses machos de 4 meses con un peso promedio de 3,2 kg para inducir anestesia general, y se hizo una incisión en la articulación de la rodilla para exponer la rótula. Se extirpó un cartílago de aproximadamente 1 mm de grosor de la rótula expuesta y se crearon tres defectos osteocondrales (diámetro de 2 mm y profundidad de 3 mm) en el surco del fémur con un taladro dental. Cada implante preparado previamente se implantó en el sitio del defecto creado para terminar la operación, se inyectaron tramadol (5 mg/kg) y oxitetraciclina (20 mg/kg) y luego se elevaron en condiciones normales.

Después de 6 semanas, se sacrificó cada conejo y se retiró el fémur de la rodilla del mismo y, a continuación, se fijó durante 5 días usando una solución de formalina tamponada neutra al 10 % (pH 7,4, BBC Biochemical, Mount Vernon, EE. UU., WA). El fémur fijo se trató con una solución de EDTA al 0,5 % para eliminar los depósitos de calcio y, a continuación, se embebió en parafina. El fémur embebido se cortó finamente para obtener secciones de tejido de 4 μ m de grosor, que se sometieron a tinción con H&E y tinción con safranina-O (figura 7).

Además, las secciones de tejido se sumergieron en peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol durante 30 minutos para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, y después se añadió proteinasa K (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.) y se hizo reaccionar a 37 °C durante 10 minutos. Una vez completada la reacción, las secciones de tejido se tiñeron con un anticuerpo contra el colágeno de tipo 2 (Calbiochem, CA, EE. UU., dilución 1:100) y se realizó una inmunotinción utilizando un kit de peroxidasa ABC-peroxidasa Vectastain Elite (Vector Laboratories Inc., CA, EE. UU.). La reacción del anticuerpo se desarrolló por color usando Vector SG (Vector Laboratories Inc., CA, EE. UU.) y la contratinción se realizó usando soluciones nucleares rápidas (Vector Laboratories Inc., CA, EE. UU.) (figura 7).

La figura 7 muestra imágenes microscópicas que muestran los resultados de la tinción con H&E, tinción con safranina-O e inmunotinción con anticuerpos contra el colágeno de tipo 2 de fémures de articulaciones de conejo en los que se

implantó un andamiaje de PLGA, un cultivo de synMSC sobre un andamiaje de PLGA (PLGA/synMSC) o un cultivo de synMSC sobre un andamiaje de PLGA cargado con BMP-7 (PLGA/synMSC/BMP-7).

5 Tal como se muestra en la figura 7, en el grupo de control, en el que no se trató el sitio dañado, la capa de cartílago no se regeneró y el sitio simplemente se cubrió con el tejido fibroso, y no se produjo tinción con safranina-O. Sin embargo, en el sitio donde se implantó el implante de armazón de PLGA, se formó una capa de cartílago, pero se formó una capa delgada de cartílago que contenía una pequeña cantidad de condrocitos, y también se formó proteoglicano en una pequeña cantidad. También se confirmó que, en el sitio donde se implantó el implante de synMSC cultivadas en el andamiaje de PLGA, el nivel de células aumentó y el cartílago se regeneró en la superficie. Finalmente, se confirmó que, en el sitio donde se implantó el implante de synMSC cultivadas en el andamiaje de PLGA cargado con BMP-7, se regeneró una capa gruesa de cartílago y estaba presente una gran cantidad de colágeno de tipo 2.

10 En consecuencia, se descubrió que las synMSC mostraban un efecto terapéutico de regeneración del hueso y el cartílago dañados, y este efecto terapéutico se mejoró con la BMP-7.

15 Basándose en la descripción anterior, los expertos en la técnica entenderán que la presente descripción puede implementarse en una forma específica diferente o características esenciales de la misma. En este respecto, debe entenderse que la realización anterior no es limitativa, sino ilustrativa en todos los aspectos. El ámbito de la descripción está definido por las reivindicaciones adjuntas y no por la descripción que las precede y, por lo tanto, todos los cambios y modificaciones dentro de los límites de las reivindicaciones, o equivalentes de tales límites, se entienden incluidos en las reivindicaciones.

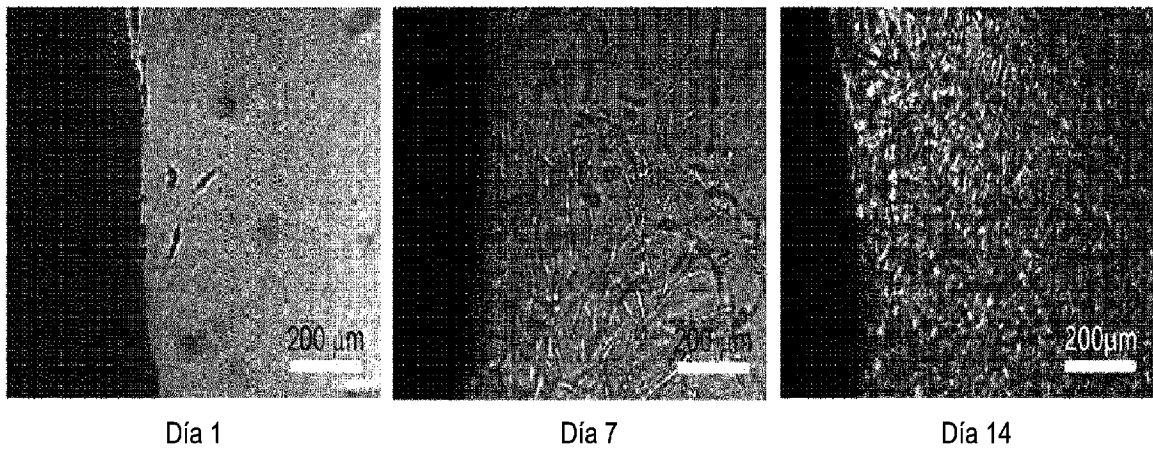
Efecto de la invención

25 Cuando se usa un método de preparación de la presente invención, las células madre pueden extraerse y obtenerse eficazmente de la membrana sinovial, y las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial obtenidas pueden tratar eficazmente el daño óseo o cartilaginoso y, por lo tanto, podrán contribuir en gran medida al desarrollo de un método para tratar el daño óseo o cartilaginoso.

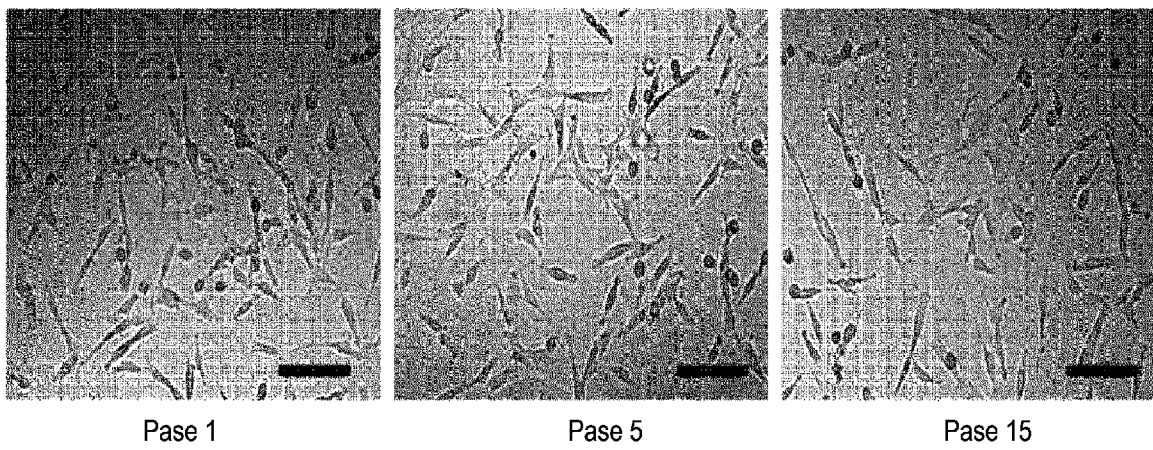
REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial, comprendiendo el método las etapas de:
- 5
- (a)encapsular un tejido sinovial en un hidrogel y cultivarlo para obtener un cultivo; y
(b)degradar el hidrogel en el cultivo obtenido para recuperar del tejido sinovial las células madre mesenquimales que migran y proliferan en el hidrogel,
10 en donde las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial tienen características inmunológicas para expresar CD29, CD44, CD73 y CD90 en la superficie celular de las mismas.
2. El método según la reivindicación 1, en donde el hidrogel consiste en un material seleccionado del grupo que consiste en colágeno, gelatina, condroitina, ácido hialurónico, ácido algínico, Matrigel™, quitosano, péptido, 15 fibrina, ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), polietilenglicol (PEG), poliacrilamida, y combinaciones de los mismos.
3. El método según la reivindicación 1, en donde la degradación del hidrogel se realiza mediante el tratamiento con una enzima seleccionada del grupo que consiste en colagenasa, gelatinasa, uroquinasa, 20 estreptoquinasa, un activador tisular del plasminógeno (TPA), plasmina, hialuronidasa, y combinaciones de las mismas.
4. Una composición farmacéutica para tratar el daño óseo o cartilaginoso, comprendiendo la composición farmacéutica, como principio activo, las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial 25 preparadas mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un cultivo de las mismas,
- en donde las células madre mesenquimales están en una forma en la que las células se cultivan sobre un soporte tridimensional de PLGA y se adhieren al mismo; y
el soporte del andamiaje de PLGA está en una forma en la que las BMP-7 se hilan sobre fibras de 30 PLGA y, por tanto, la BMP-7 encapsulada se une a las fibras de PLGA.
5. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en donde las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial tienen una capacidad mejorada para regenerar el cartílago mediante la adición de 35 BMP-7.
6. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en donde las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial tienen una mayor síntesis de GAG.
7. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en donde las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial tienen niveles de expresión aumentados de SOX-9, agrecano y colágeno de tipo 2. 40
8. Una composición farmacéutica para tratar el daño óseo o cartilaginoso, comprendiendo la composición farmacéutica, como principio activo, las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial preparadas mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un cultivo de las mismas, 45 en donde las células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial tienen características inmunológicas para expresar CD29, CD44, CD73 y CD90 en la superficie celular de las mismas.

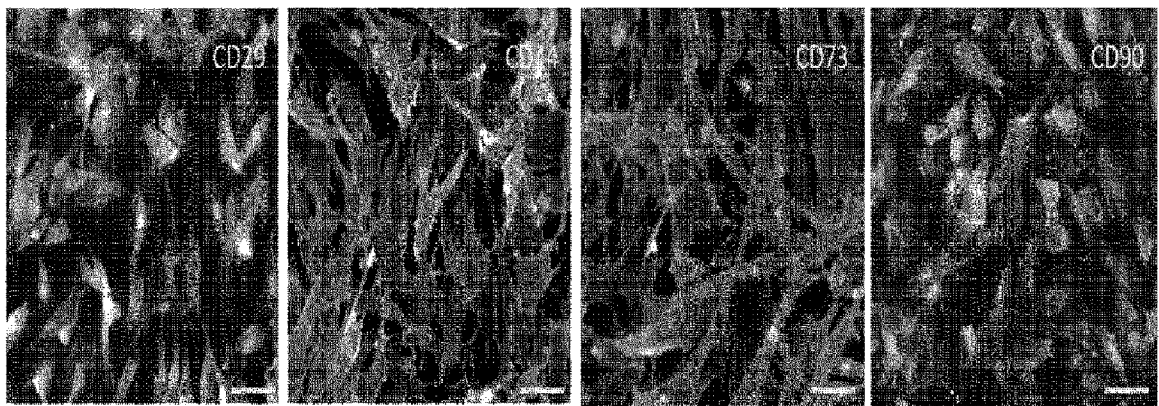
[Figura 1A]



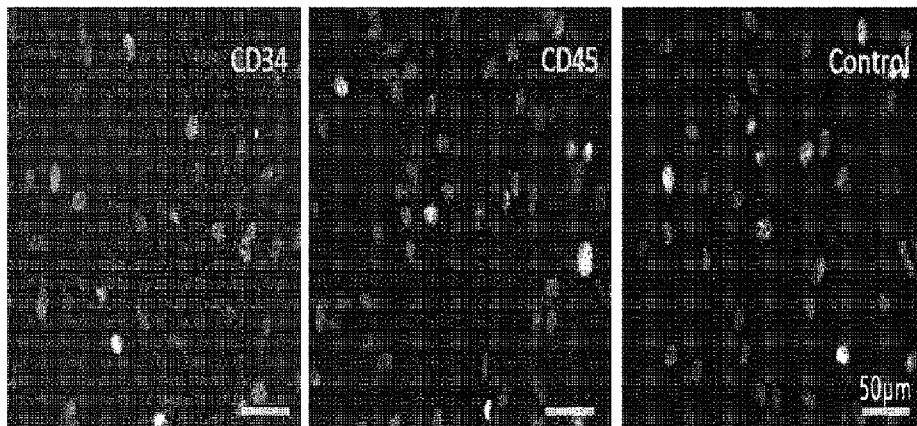
[Figura 1B]



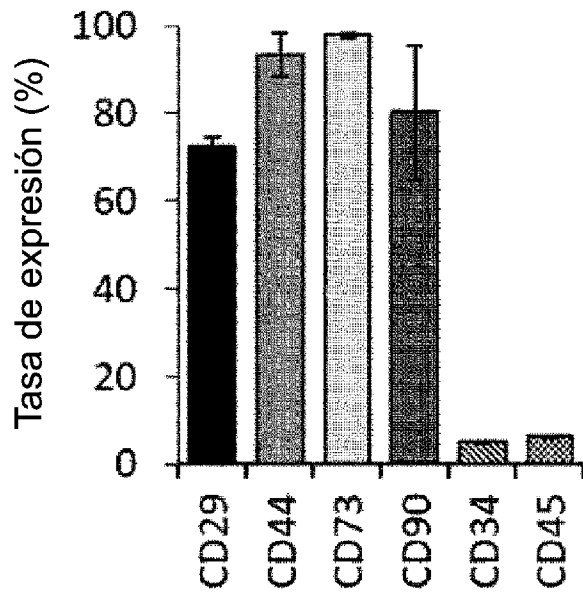
[Figura 2A]



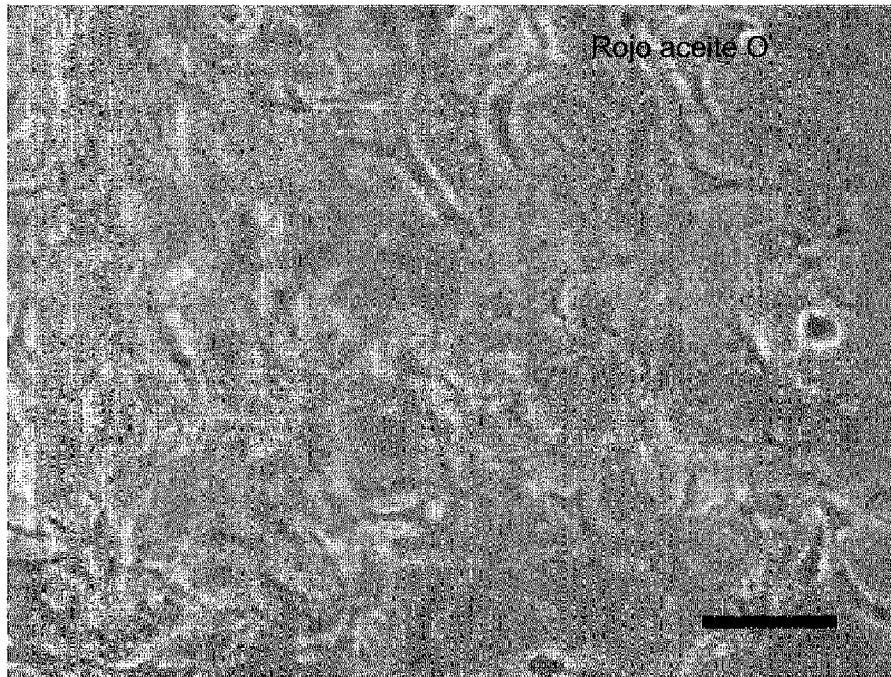
[Figura 2B]



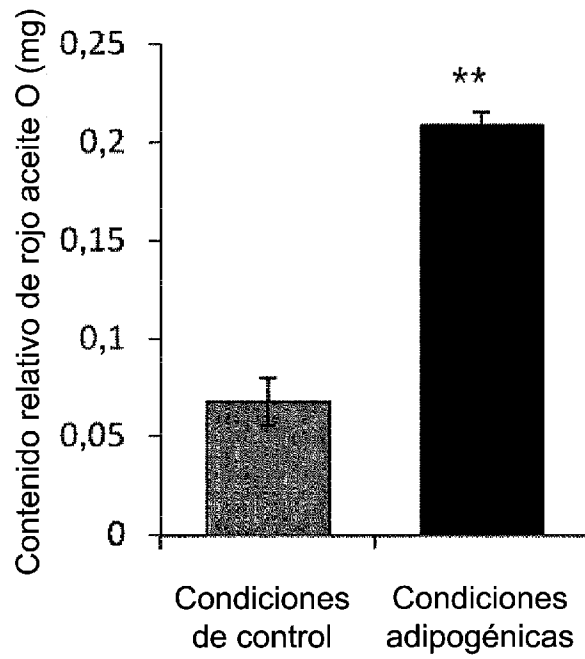
[Figura 2C]



[Figura 3A]



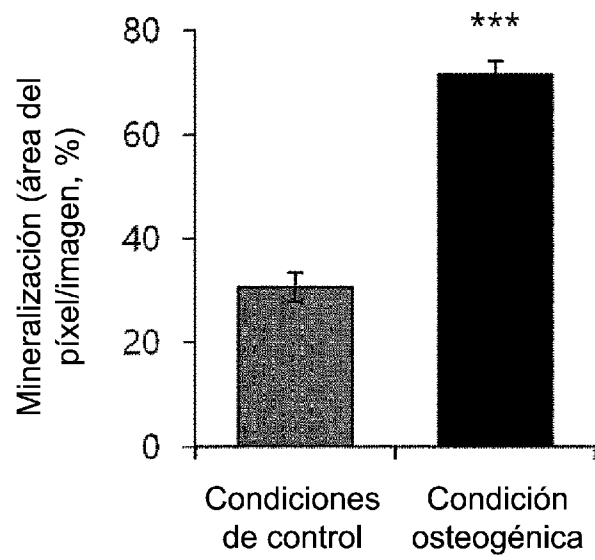
[Figura 3B]



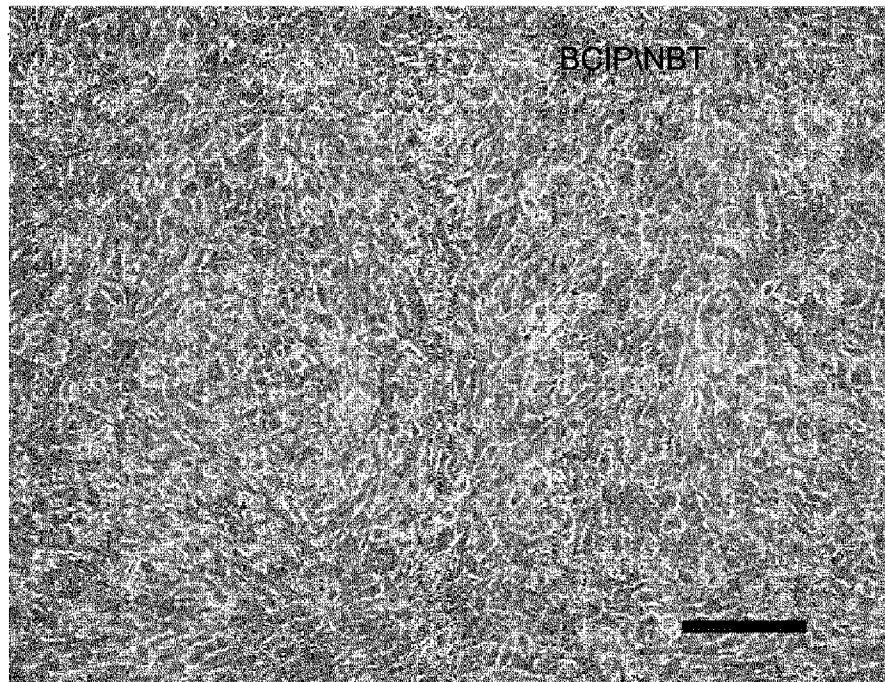
[Figura 3C]



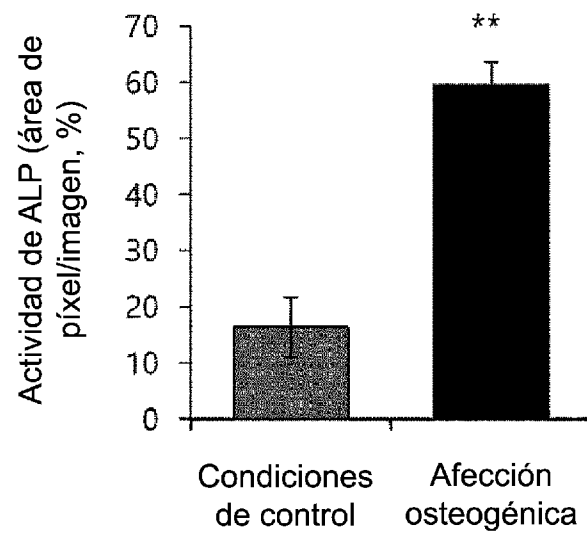
[Figura 3D]



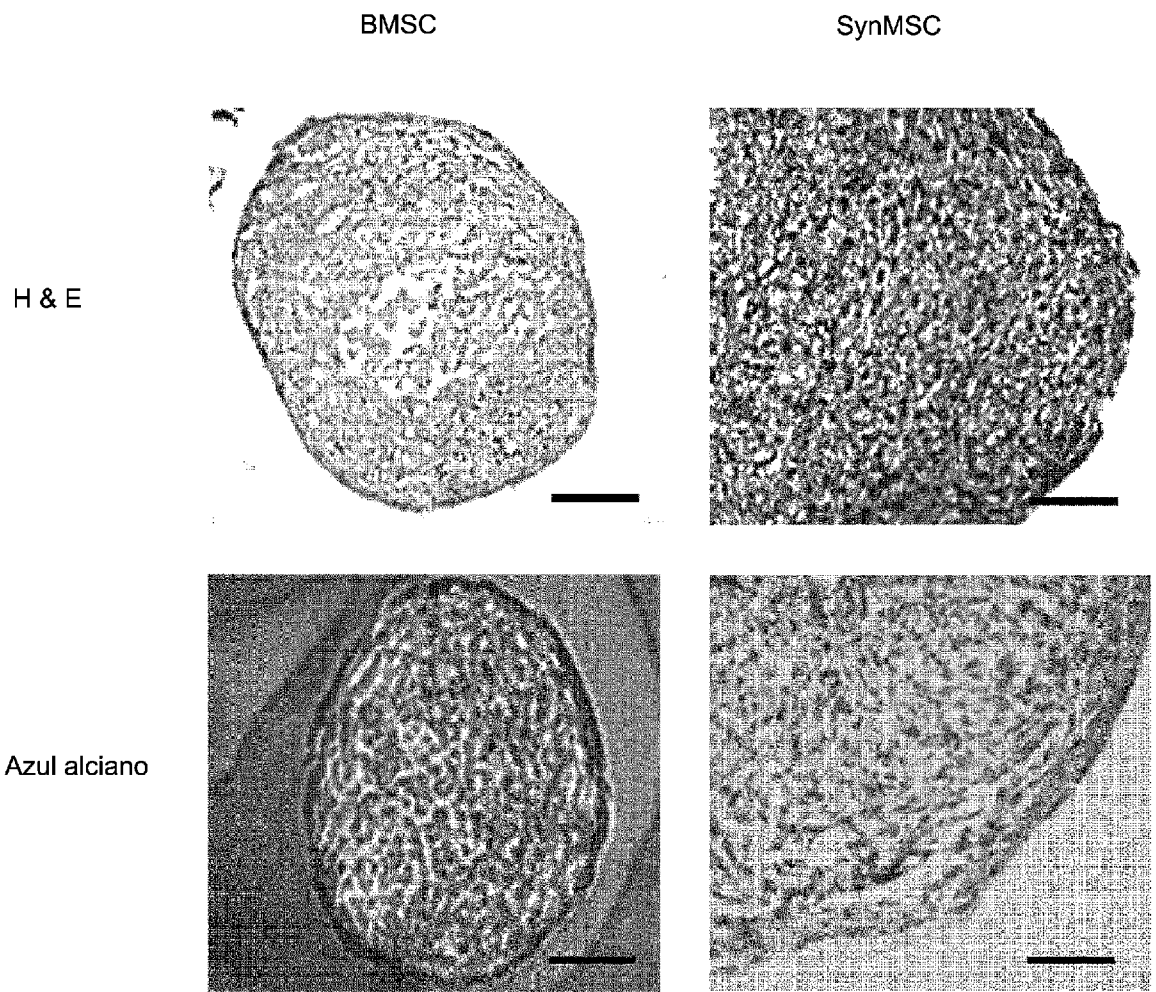
[Figura 3E]



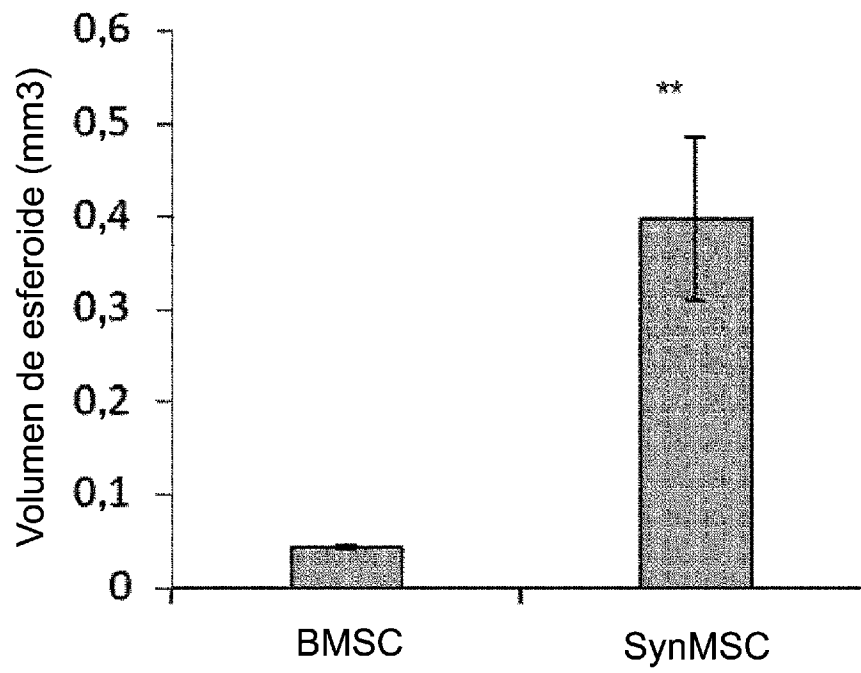
[Figura 3F]



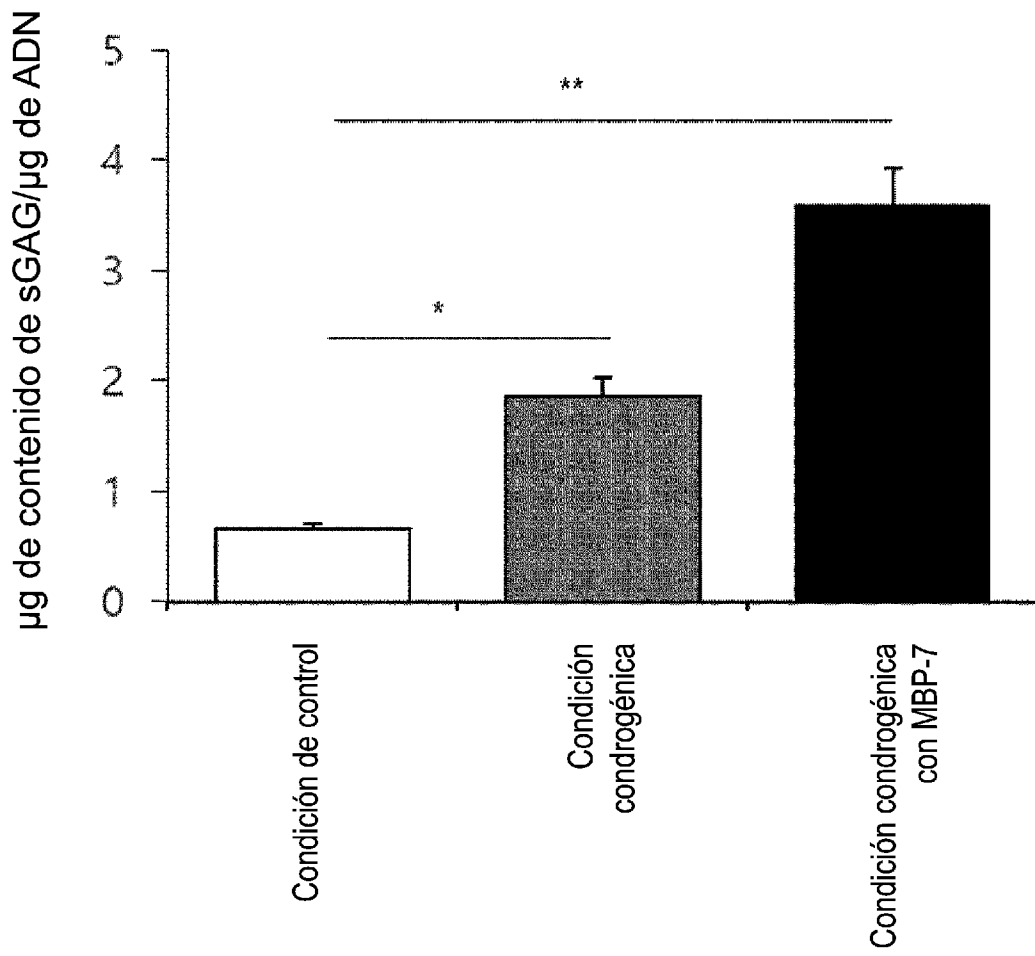
[Figura 4A]



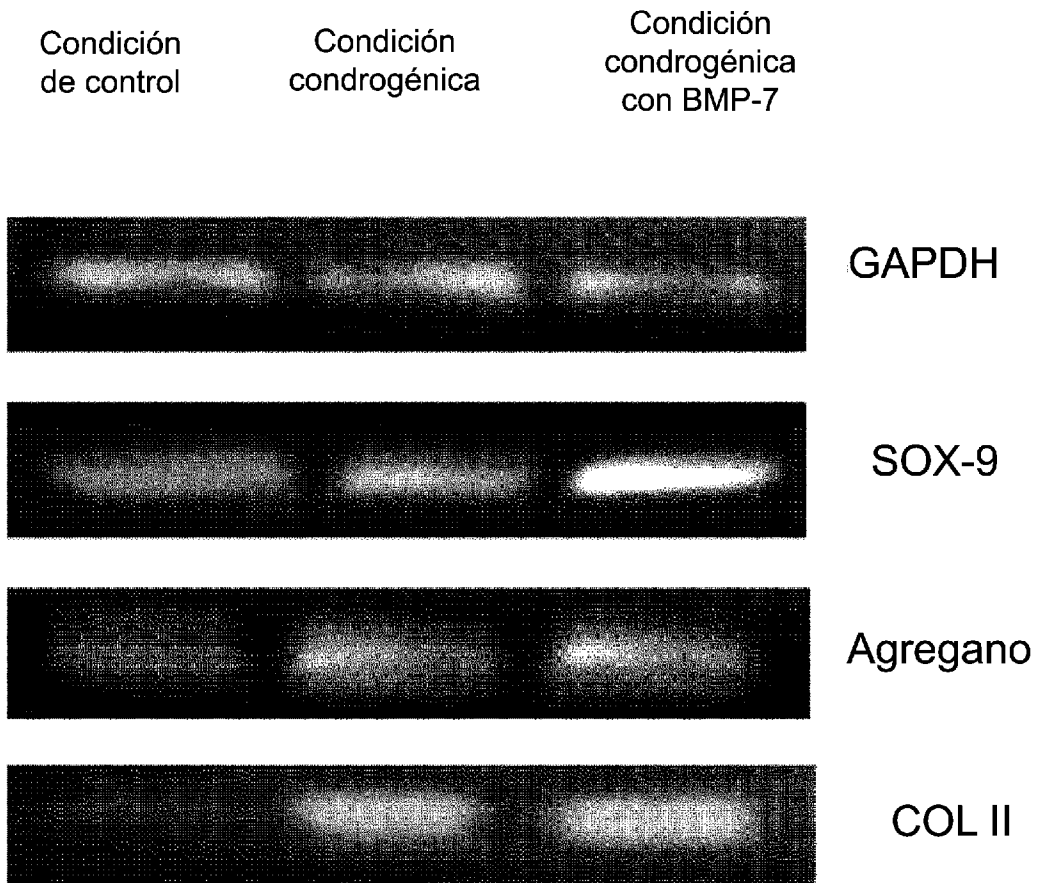
[Figura 4B]



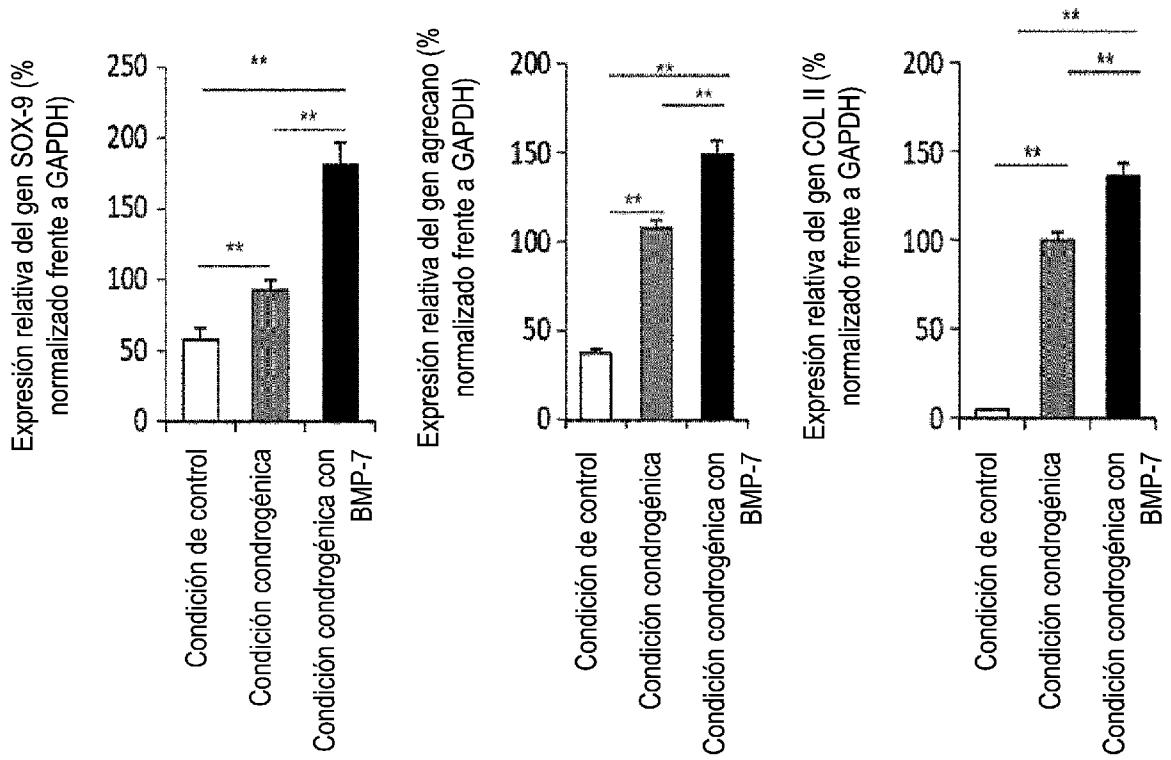
[Figura 5A]



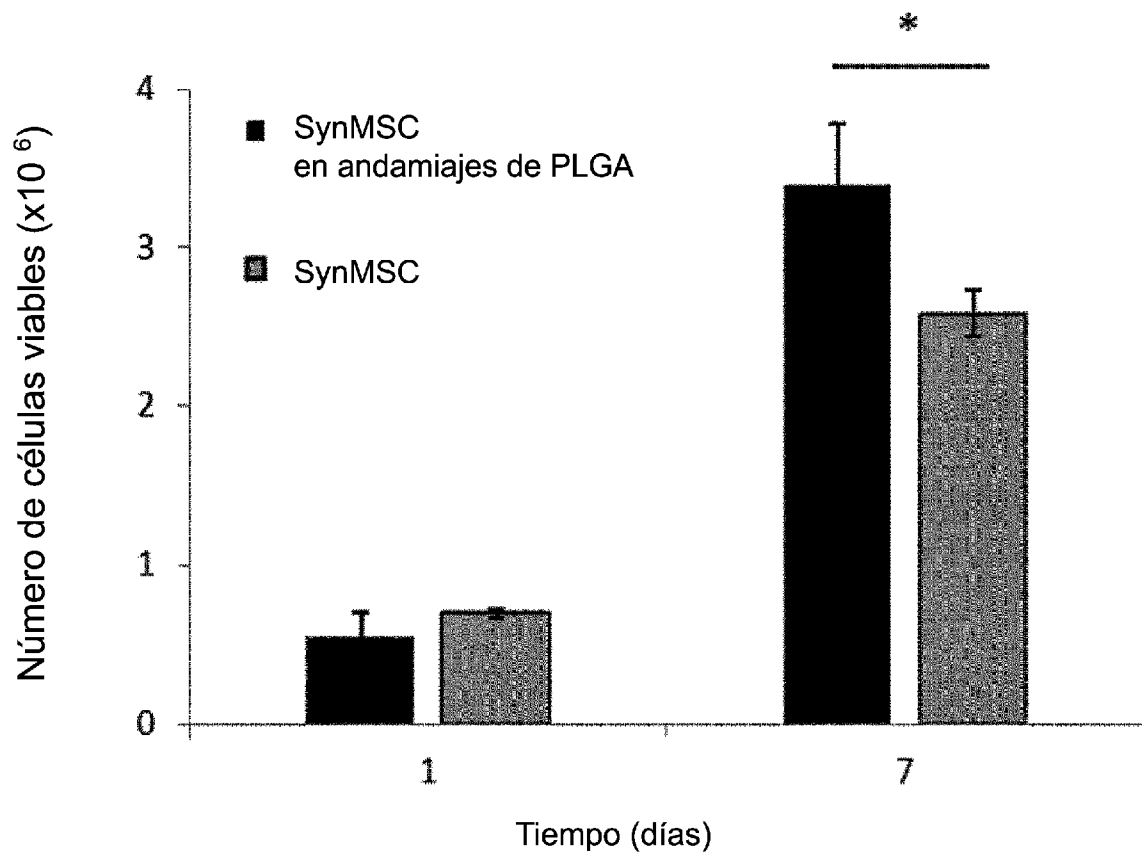
[Figura 5B]



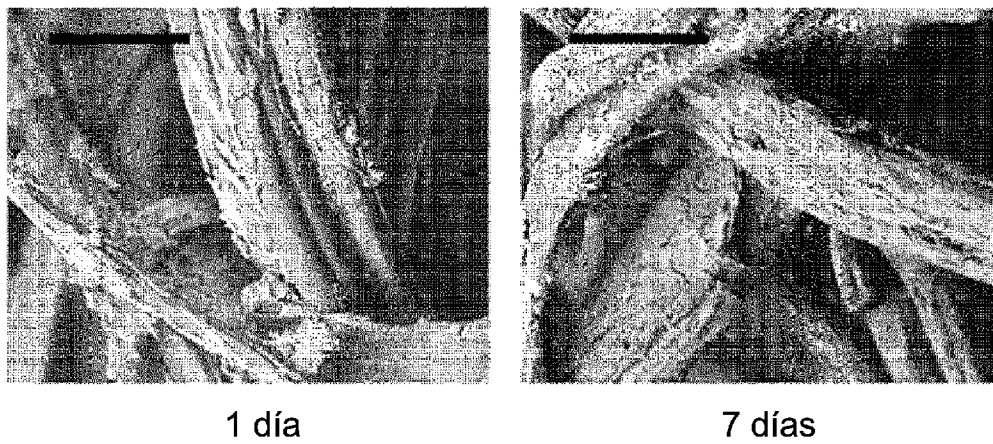
[Figura 5C]



[Figura 6A]



[Figura 6B]



[Figura 7]

