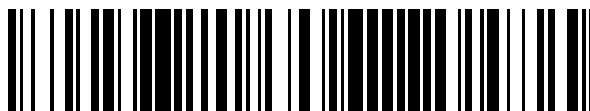


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 567**

51 Int. Cl.:

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>C12N 5/0775</b> | (2010.01) |
| <b>C12N 5/0735</b> | (2010.01) |
| <b>C12N 5/077</b>  | (2010.01) |
| <b>C12N 5/073</b>  | (2010.01) |
| <b>A61K 35/50</b>  | (2015.01) |
| <b>A61P 19/00</b>  | (2006.01) |
| <b>A61P 19/02</b>  | (2006.01) |
| <b>A61P 19/04</b>  | (2006.01) |
| <b>A61P 19/08</b>  | (2006.01) |
| <b>A61P 25/00</b>  | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2015 PCT/KR2015/000204**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15105356**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2015 E 15734962 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021 EP 3093339**

54 Título: **Células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura y terapia celular que comprende las mismas**

30 Prioridad:

**08.01.2014 KR 20140002308**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.10.2021**

73 Titular/es:

**SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE  
FOUNDATION (100.0%)  
48 Itaewon-ro 55-gil, Yongsan-gu  
Seoul 140-210, KR**

72 Inventor/es:

**HA, CHUL WON y  
KIM, JIN A**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 870 567 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 procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura y terapia celular que comprende las mismas

**5 [Campo técnico]**

La presente divulgación se refiere a células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura (capa trofoblástica coriónica sin vellosidades, TC-V) que forma parte de los tejidos de la placenta y a un agente terapéutico celular que incluye a las mismas.

10

**[Antecedentes de la técnica]**

Recientemente, la biotecnología ha propuesto la posibilidad de nuevas soluciones a los problemas alimentarios, ambientales y de salud como meta final del bienestar humano y, entre ellas, está surgiendo una técnica que utiliza células madre como una nueva técnica de tratamiento de enfermedades incurables. Para este tratamiento de enfermedades del ser humano, se han propuesto anteriormente el trasplante de órganos, la terapia génica, y similares, pero no es suficiente una comercialización eficaz debido al rechazo inmunitario, la escasez de los órganos suministrados y la falta de conocimiento sobre el desarrollo de vectores o genes de enfermedades. Como resultado, aumenta el interés en las células madre totipotentes, y se reconoce que las células madre totipotentes que tienen la capacidad de generar todos los órganos a través de la proliferación y diferenciación tratan la mayoría de las enfermedades y resuelven esencialmente el daño en los órganos. Además, muchos científicos han propuesto de diversas formas el potencial de las células madre incluso para tratamientos para la enfermedad de Parkinson, que es incurable, de diversos cánceres, de la diabetes y de lesiones de la médula espinal, y similares, así como la regeneración de casi todos los órganos del cuerpo humano.

25

"Células madre" se refiere a células que tienen capacidad de autorreplicación como células no diferenciadas y una capacidad de diferenciación en dos o más tipos distintos de células. Las células madre se clasifican en células madre totipotentes, células madre pluripotentes y células madre multipotentes, de acuerdo con su capacidad de diferenciación, y también pueden clasificarse en células madre embrionarias y células madre adultas de acuerdo con su origen citológico. Las células madre embrionarias se obtienen de un embrión antes de la implantación o de tejido genital de un feto durante la generación; mientras que las células madre adultas se obtienen de todos los órganos presentes en el adulto, por ejemplo, de médula ósea, de cerebro, de hígado, de páncreas y similares.

30

Dado que las células madre embrionarias suponen un problema ético, existe una limitación para su uso como agente terapéutico celular. Por otro lado, las células madre adultas pueden extraerse principalmente de grasa, de sangre de cordón umbilical, de médula ósea, de placenta, y similares, y no suponen ningún problema ético. En particular, durante el parto, las células madre de grasa en un tejido graso y las células madre placentarias en la placenta, son estables y tienen una excelente diferenciación para su uso para mejorar los síntomas de diversas enfermedades de daño celular tales como la diabetes, la demencia, la artritis, el infarto de miocardio, el infarto cerebral y la insuficiencia renal, que son enfermedades incurables que no se tratan con la medicina moderna.

35

40

Entre ellas, en el caso de las células madre procedentes de la placenta, utilizando la placenta desechada después del parto, es ventajoso que la extracción sea fácil y que se pueda asegurar fácilmente una gran cantidad de células madre. Las células madre procedentes de la grasa o de la médula ósea están influenciadas por la edad o el estado de salud de los donantes de donde se aíslan y extraen, por presentar una limitación en la capacidad de proliferación o diferenciación y tener una gran variabilidad. Sin embargo, la capacidad de las células madre procedentes de la placenta no se ve prácticamente influenciada por parámetros tales como la edad de los donantes, dado que las células madre pueden obtenerse en la etapa más temprana entre las células madre adultas y, además, tales células madre tienen una excelente capacidad de proliferación y diferenciación. Además, de las células madre procedentes de la placenta, puede aislarse un grupo de células madre que puede utilizarse para diversas enfermedades, tales como trastornos del sistema nervioso, enfermedades hepáticas y enfermedades osteomusculares.

45

50

Debido a las ventajas mencionadas anteriormente, se han realizado activamente investigaciones sobre las células madre procedentes de la placenta. Por ejemplo, en la patente de Corea N.º de Registro 818214, se propone un método de aislamiento de células madre a partir de una membrana amniótica o una decidua utilizando un medio que incluye N-acetil-L-cisteína (NAC), y en la Patente de Corea N.º de Registro 871984, se propone un método de cultivo de células madre procedentes de membrana amniótica, membrana serosa, decidua basal y tejido placentario utilizando un medio que incluye factor básico de crecimiento de los fibroblastos (bFGF), y en la Patente de Corea N.º de publicación 10-2007-0052204, se propone un método de aislamiento de células madre a partir de vellosidades coriónicas de una capa trofoblástica coriónica de la placenta. Sin embargo, hasta ahora, no se han realizado aún investigaciones sobre células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura, que forma parte de los tejidos de la placenta.

55

60

**[Divulgación]**

**[Problema técnico]**

En estas circunstancias, los presentes inventores han realizado estudios intensivos para desarrollar células madre que tengan una capacidad de células madre más excelente a partir de las células madre procedentes de la placenta. Como resultado, los presentes inventores han completado la presente divulgación verificando que las células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura (capa trofoblástica coriónica sin vellosidades, TC-V), que forma parte de los tejidos de la placenta, presentan una característica de crecimiento uniforme y características magníficas de proliferación y de diferenciación en comparación con las células madre convencionales procedentes de la placenta completa y, en particular, presentan una excelente diferenciación en células de cartilago, por lo que pueden utilizarse de forma eficaz como agente terapéutico celular.

Posteriormente, en el presente documento se describe el suministro de células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de los tejidos de la placenta.

En el presente documento también se describe el suministro de un agente terapéutico celular y una composición para la regeneración de tejidos que, como principio activo, incluyen células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de los tejidos de la placenta; o células diferenciadas a partir de las células madre.

**[Solución técnica]**

La presente memoria descriptiva describe células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de los tejidos de la placenta.

La presente memoria descriptiva también describe un agente terapéutico celular que, como principio activo, incluye células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de los tejidos de la placenta o células diferenciadas a partir de las células madre.

Por lo tanto, la presente divulgación describe una composición para la regeneración de tejidos que, como principio activo, incluye células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de los tejidos de la placenta o células diferenciadas a partir de las células madre.

De acuerdo con una primera realización principal, la invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para la preparación de células madre; caracterizado por que comprende una etapa de aislamiento de las células madre a partir de una capa trofoblástica coriónica aislada sin vellosidades.

De acuerdo con una realización particular, las células madre aisladas pueden ser positivas para los marcadores de superficie CD44, CD73, CD90 y CD105.

De acuerdo con una realización particular, las células madre aisladas son negativas para los marcadores de superficie CD31, CD34, CD45 y HLA-DR.

De acuerdo con una realización particular, la capa trofoblástica coriónica sin vellosidades está situada entre una membrana coriónica y una decidua.

De acuerdo con una realización particular, las células madre se preparan mediante las siguientes etapas: (a) aislamiento de una capa trofoblástica coriónica sin vellosidades, que forma parte de los tejidos de la placenta, a partir de la placenta; (b) obtención de células procedentes de la capa trofoblástica coriónica sin vellosidades mediante el tratamiento con una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en tripsina, colagenasa, dispasa, ADNasa, ARNasa, proteasa, lipasa, hialuronidasa y elastasa de la capa trofoblástica coriónica aislada sin tejido de vellosidades; y (c) selección de las células madre a partir de las células obtenidas procedentes de la capa trofoblástica coriónica sin vellosidades.

De acuerdo con una realización particular, las células madre tienen la capacidad de diferenciarse en células condrogénicas, adipogénicas, osteogénicas, neuronas, de ligamento y tenocitos.

De acuerdo con una segunda realización principal, la invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* de diferenciación de células madre; caracterizado por que comprende una etapa de diferenciación de células madre aisladas a partir de una capa trofoblástica coriónica aislada sin vellosidades.

De acuerdo con una realización particular, el método comprende una etapa de diferenciación de dichas células madre en células condrogénicas, adipogénicas, osteogénicas, neuronas, de ligamento o tenocitos.

**[Efectos ventajosos]**

Las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (capa trofoblástica coriónica sin vellosidades, TC-V) pueden presentar una característica de crecimiento uniforme y características magníficas de proliferación y diferenciación en comparación con las células madre procedentes de la placenta completa en la técnica relacionada.

En particular, las células madre pueden presentar una excelente diferenciación en células de cartílago, de este modo, pueden utilizarse de manera útil como el agente terapéutico celular y la composición de regeneración tisular para el tratamiento del daño del cartílago, un defecto del cartílago, o similar.

5 **[Descripción de los dibujos]**

10 La FIG. 1 es un diagrama que ilustra una forma en que el epitelio amniótico (EA), una membrana amniótica (MA), una membrana coriónica (MC), una capa trofoblástica coriónica pura (capa trofoblástica coriónica sin vellosidades; TC-V), las vellosidades coriónicas (VC) y la decidua (DC) de la placenta se disponen de forma estratificada, secuencialmente desde la parte superior, como una microfotografía que ilustra una sección transversal de la placenta.

15 La FIG. 2 es un diagrama que ilustra fotografías (x100) que se obtienen mediante la observación, mediante un microscopio, de las formas celulares antes del subcultivo (P0) y después del subcultivo prolongado (P28) de células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V).

La FIG. 3 es un diagrama que ilustra fotografías (x100) que se obtienen mediante la observación, mediante un microscopio, de las formas celulares antes del subcultivo (P0) y después del subcultivo prolongado (P29) de células madre procedentes de la placenta completa.

20 La FIG. 4 es un diagrama que ilustra las unidades formadoras de colonias de las células madre procedentes de la placenta completa y las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V).

La FIG. 5 es un diagrama que ilustra los tiempos de duplicación de la población de las células madre procedentes de la placenta completa y las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V).

25 La FIG. 6 es un diagrama que ilustra el resultado de un análisis de células parenquimatosas para verificar la expresión de factores de superficie característicos de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V).

30 La FIG. 7 es un diagrama que ilustra los resultados de la tinción para observar los grados de las diferenciaciones de las células madre procedentes de la placenta completa y las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) en adipogénicas (adipogénesis), condrogénicas (condrogénesis) u osteogénicas (osteogénesis), respectivamente.

35 La FIG. 8 es un diagrama que ilustra los resultados cuantificados obtenidos después de realizar una tinción con Safranina-O para observar los grados de las diferenciaciones de las células madre procedentes de la placenta completa y las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) en condrogénicas.

40 La FIG. 9 es un diagrama que ilustra los resultados cuantificados obtenidos después de realizar una tinción inmunohistoquímica utilizando colágeno de tipo II para observar los grados de las diferenciaciones de las células madre procedentes de la placenta completa y las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) en condrogénicas

45 La FIG. 10 es un diagrama que ilustra los resultados de la comparación y el análisis de los grados de las diferenciaciones de las células madre procedentes de la placenta completa y las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) en adipogénicas, condrogénicas u osteogénicas.

**[Modos de la divulgación]**

50 En lo sucesivo en el presente documento, se describirá en detalle la presente divulgación.

La presente divulgación proporciona células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura (capa trofoblástica coriónica sin vellosidades, TC-V) que forma parte de los tejidos de la placenta.

55 "Células madre" se refiere a células que tienen capacidad de autorreplicación y capacidad de diferenciación en dos o más tipos distintos de células. Las células madre pueden clasificarse en células madre totipotentes, células madre pluripotentes y células madre multipotentes, de acuerdo con su capacidad de diferenciación.

60 Las "células madre totipotentes" son células que tienen una propiedad totipotente que pueden diferenciarse en un objeto completo, las células de las fases de hasta 8 células después de la fertilización del óvulo y el esperma tienen la propiedad totipotente, y célula madre totipotente significa que la célula se diferenciará en un objeto completo cuando las células se aislen y, después, se trasplantan al útero. Las "células madre pluripotentes" son células que pueden diferenciarse en diversas células y tejidos procedentes de capas del ectodermo, mesodermo y endodermo, y proceden de una masa celular interna situada en el blastocisto que se muestra después de 4 a 5 días de la fertilización, que se llaman células madre embrionarias. Células madre pluripotentes significa células que se diferencian en diversas células de tejido diferentes, pero no forman un organismo nuevo. "Células madre multipotentes" se refiere a células

que pueden diferenciarse solo en células específicas que forman un tejido y un órgano que incluyen células madre. Para los fines de la presente divulgación, las "células madre" pueden ser preferentemente las células madre multipotentes.

5 "Placenta" se refiere a un tejido formado *in vivo* durante el embarazo para el feto y tiene una forma de disco con un peso de 500 a 600 g, un diámetro de 15 a 20 cm y un grosor de 2 a 3 cm. Un lado de la placenta está en contacto con la madre y el otro lado está en contacto con el feto, y los nutrientes y el oxígeno se transfieren entre ellos, entre la sangre de la madre y los vasos sanguíneos del feto. La placenta puede dividirse fundamentalmente en tres capas, la membrana amniótica, la membrana coriónica y la decidua, y más particularmente, en el epitelio amniótico, la  
10 membrana amniótica, la membrana coriónica, la capa trofoblástica coriónica y la decidua. La decidua es una membrana que se forma cuando las células epiteliales del útero se modifican para que el embrión se implante en el útero. En la FIG. 1 se ilustra brevemente una vista en sección transversal de la placenta.

15 "Capa trofoblástica coriónica pura" se refiere a un tejido del que se eliminan las vellosidades coriónicas de la membrana coriónica en la capa trofoblástica coriónica situada entre la membrana coriónica y la decidua.

Las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura pueden obtenerse cultivando y después recogiendo las células obtenidas al realizar una reacción enzimática añadiendo una solución enzimática al tejido de la capa trofoblástica coriónica pura aislado de la placenta, en un medio al que se ha añadido suero fetal bovino y  
20 antibióticos, sin utilizar factores de crecimiento.

Más particularmente, las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura pueden obtenerse mediante las siguientes etapas:

- 25 (a) aislamiento de una capa trofoblástica coriónica pura (capa trofoblástica coriónica sin vellosidades, TC-V) que forma parte de los tejidos de la placenta, de la placenta;  
(b) obtención de células procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura mediante el tratamiento con uno o más tipos de enzimas seleccionadas del grupo que consiste en tripsina, colagenasa, dispasa, ADNasa, ARNasa, proteasa, lipasa, hialuronidasa y elastasa, en el tejido de la capa trofoblástica coriónica pura aislado; y  
30 (c) selección de las células madre a partir de las células obtenidas procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá en detalle cada etapa de un método de fabricación de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura.  
35

La etapa (a) es un procedimiento de aislamiento de la capa trofoblástica coriónica pura como parte de los tejidos de la placenta, y el método de aislamiento no se limita particularmente a ello, sino que puede realizarse mediante un método de aislamiento mecánico utilizando pinzas W, un cúter y similares, un método de aislamiento químico utilizando un tratamiento enzimático y similares. Además, después de la etapa (a), la sangre procedente de la placenta puede eliminarse preferentemente lavando el tejido aislado y, en este caso, puede utilizarse PBS como solución de lavado, y no se limita al mismo.  
40

La etapa (b) es una etapa de obtención de células procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura mediante el tratamiento con uno o más tipos de enzimas seleccionadas de un grupo que consiste en tripsina, colagenasa, dispasa, ADNasa, ARNasa, proteasa, lipasa, hialuronidasa y elastasa, en el tejido de la capa trofoblástica coriónica pura. La colagenasa incluye colagenasa A, I, II, III o IV. Como método para completar la reacción enzimática, puede utilizarse preferentemente un método de adición de un medio que incluya suero fetal bovino, pero sin limitarse particularmente a ello.  
45

La etapa (c) es una etapa de selección de las células madre a partir de las células procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura, y puede realizarse preferentemente un método de selección mediante un método de cultivo de las células procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura obtenidas mediante la etapa (b) en un recipiente de cultivo, uniendo las células cultivadas al fondo del recipiente de cultivo y seleccionando las células cultivadas unidas, pero sin limitarse a ello. En este caso, el medio utilizado durante el cultivo pueden ser todos los medios utilizados en el cultivo de células madre, pero sin limitarse particularmente a ello. Puede utilizarse preferentemente un medio que incluya suero sin un factor de crecimiento y antibióticos.  
50  
55

Se elimina el tejido no descompuesto filtrando las células obtenidas en la etapa (b) con una malla y las células filtradas se lavan utilizando un medio al que se le ha añadido el suero fetal bovino y los antibióticos. Las células lavadas se cultivan en un medio al que se le ha añadido el suero fetal bovino y los antibióticos, sin el factor de crecimiento, y se seleccionan las células madre mesenquimatosas unidas al fondo del recipiente de cultivo. Las células madre mesenquimatosas seleccionadas tienen formas proyectadas y alargadas con un aspecto que presenta una característica morfológica similar a las de las células fibroblásticas.  
60

Las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura, como parte de los tejidos de la placenta, tienen las siguientes características:  
65

- (a) una característica morfológica en forma de célula fibroblástica;  
 (b) una capacidad de proliferación durante un período prolongado de manera que se alcanza un número de pases de 25 a 30 o más;
- 5 (c) una capacidad de diferenciación en adipogénicas, condrogénicas u osteogénicas;  
 (d) una capacidad de formación de colonias;  
 (e) características inmunitarias positivas para CD44, CD73, CD90 y CD105; y  
 (f) características inmunitarias negativas para CD31, CD34, CD45 y HLA-DR.
- 10 Las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura pueden diferenciarse en distintos tipos de células, como se indica en el siguiente método, y, por ejemplo, pueden diferenciarse en diversos tipos de células, tales como adipogénicas, condrogénicas, osteogénicas, neuronas, de ligamento o tenocitos, y la presente divulgación no se limita a ellas.
- 15 "Diferenciación" generalmente significa un fenómeno en el que un límite relativamente simple se divide en dos o más partes cualitativamente distintas y, en particular, significa un fenómeno en el que se especifican distintas estructuras o funciones mientras las células se dividen, proliferan y crecen, es decir, las formas o funciones cambian para que las células, tejidos, y similares, del organismo, realicen respectivamente tareas determinadas. Por el contrario, "no diferenciación" significa un estado en el que no se produce la diferenciación mencionada anteriormente y aún se incluyen características como las de las células madre.
- 20 Puede realizarse un método de diferenciación de las células madre de acuerdo con un método conocido existente y no se limita particularmente al mismo. Por ejemplo, preferentemente, el método puede ser un método de diferenciación de las células madre en adipogénicas mediante el cultivo de las células madre en un medio que incluye dexametasona, indometacina, insulina y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX); un método de diferenciación de las células madre en condrogénicas mediante el cultivo de las células madre en un medio que incluye dexametasona, proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), ácido ascórbico y L-prolina; un método de diferenciación de las células madre en osteogénicas mediante el cultivo de las células madre en un medio que incluye dexametasona, ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato y ácido ascórbico-2-fosfato; y similares.
- 25 Como método para medir el grado de diferenciación de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura diferenciadas mediante el método descrito anteriormente, puede utilizarse un método de análisis de células parenquimatosas, un método inmunocitoquímico, un método de medición de un marcador de superficie celular o un cambio en la forma, utilizando una PCR o un perfil de expresión génica, un método de examen de un cambio morfológico de las células utilizando un microscopio óptico o un microscopio confocal, un método de medición de un cambio en un perfil de expresión génica, y similares, que se conocen en la técnica relacionada, pero sin limitarse a ello. Preferentemente, puede utilizarse RT-PCR, un método de tinción de rojo aceite O, un método de tinción de safranina O, un método de tinción inmunohistoquímica de colágeno de tipo II, un método de tinción de fosfato alcalino (ALP), un método de tinción de rojo alizarina S, o similar.
- 30 Las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (la capa trofoblástica coriónica sin vellosidades, TC-V) presentan una característica de crecimiento uniforme y características magníficas de proliferación y diferenciación en comparación con las células madre procedentes de la placenta completa en la técnica relacionada y, en particular, tienen una excelente diferenciación en condrogénicas.
- 35 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un agente terapéutico celular que, como principio activo, incluye células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura (capa trofoblástica coriónica sin vellosidades, TC-V) que forma parte de los tejidos de la placenta o células diferenciadas a partir de las células madre.
- 40 Las células diferenciadas incluyen adipogénicas, condrogénicas, osteogénicas, neuronas, de ligamento, tenocitos, y similares, y pueden seleccionarse de acuerdo con un fin terapéutico.
- 45 La expresión "agente terapéutico celular" en la presente memoria descriptiva, como un fármaco (reglamentos de la FDA de EE.UU.) utilizado para el tratamiento, el diagnóstico y la prevención utilizando células y tejidos preparados mediante el aislamiento a partir del ser humano, el cultivo y una manipulación específica, significa un fármaco utilizado para el tratamiento, el diagnóstico y la prevención de enfermedades utilizando las células a través de una serie de acciones tales como la proliferación y la selección *in vitro* de células vivas propias, homogéneas o heterogéneas, para restablecer las funciones de las células o los tejidos, cambiar una característica biológica de las células por otro método, y similares.
- 50 Preferentemente, el agente terapéutico celular descrito en el presente documento puede utilizarse para el tratamiento de un daño del cartílago, un defecto del cartílago, un defecto óseo, un defecto del tendón/ligamento o un defecto del tejido graso.
- 55 En la presente divulgación, el "defecto del cartílago" tiene un significado que incluye daño, defecto o falta del cartílago incluido en el cuerpo y, por ejemplo, incluye lesión del cartílago, desgarramiento del cartílago, condromalacia, necrosis del
- 60
- 65

cartílago, osteocondrosis, pérdida de cartílago, artrosis o similares, pero la presente divulgación no se limita a ellos.

Las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura pueden utilizarse en diversos tipos de protocolos de tratamiento que son controlar, reforzar, tratar o sustituir mediante injerto, trasplante o infusión de una colonia celular deseada, de tejidos u órganos del cuerpo, por ejemplo, una colonia de células madre o células diferenciadas. Las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura pueden convertirse en un tejido nuevo o modificado o unirse a un tejido o estructura biológica reemplazando o reforzando un tejido existente.

Adicionalmente, las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura pueden trasplantarse en la articulación para tratar lesiones del cartílago articular o trasplantarse a una porción de tendón o ligamento para su uso para tratamiento o prevención. Por ejemplo, las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura pueden trasplantarse en la articulación, porción de tendón o ligamento para favorecer la recuperación o el ajuste de la porción dañada del tejido, o pueden utilizarse para la reconfiguración o regeneración del tejido de la articulación (por ejemplo, la rodilla y similares) utilizando un material procedente de las células madre tal como construcciones de tejido cartilaginoso procedentes de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura de la presente divulgación o el tratamiento del tejido mediante métodos tales como regeneración.

La cantidad de trasplante preferible del agente terapéutico celular varía de acuerdo con el estado y el peso del objeto, el grado de la enfermedad, la forma farmacológica y la vía y el período de trasplante, pero los expertos en la materia pueden seleccionarla adecuadamente. El trasplante puede realizarse una o varias veces al día.

Además, la presente memoria descriptiva describe una composición para la regeneración de tejidos que, como principio activo, incluye células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura o células diferenciadas a partir de las células madre.

Los tejidos no están particularmente limitados, sino que incluyen tejidos tales como cartílago, grasa, hueso, nervios, ligamento y tendón, y son preferentemente cartílago.

El cartílago incluye cartílago hialino, fibrocartílago, cartílago elástico o similares, y, por ejemplo, puede ser cartílago articular, cartílago de la oreja, cartílago nasal, cartílago del codo, menisco, cartílago de la rodilla, cartílago costal, cartílago del tobillo, cartílago traqueal, cartílago laríngeo o cartílago raquídeo, pero la presente divulgación no se limita a ellos.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente memoria descriptiva se describirá en más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Los ejemplos son para describir la presente divulgación en detalle.

#### **Ejemplo 1: Preparación de células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de tejidos de la placenta**

Se extrajo la placenta de una madre que accedió a la donación en un parto por cesárea normal en el Samsung Seoul Hospital de acuerdo una directriz de la comisión de ética de ensayos clínicos del Samsung Seoul Hospital. El tejido placentario se colocó en un recipiente estéril y después se transfirió. Después de extraer la membrana amniótica del tejido placentario transferido, se aisló una capa trofoblástica coriónica, situada entre una membrana coriónica (MC) y la decidua (DC), y utilizando una pinza W y un cúter esterilizados, se aisló cuidadosamente una capa trofoblástica coriónica pura (una capa trofoblástica coriónica sin vellosidades, TC-V) de la capa trofoblástica coriónica. En la FIG. 1 se ilustró una vista en sección transversal de la placenta.

El tejido de la capa trofoblástica coriónica pura aislado se lavó varias veces utilizando PBS para eliminar la sangre y las células sanguíneas y a continuación se cortó tan finamente como fue posible. Después de ello, se añadió un medio DMEM que incluía colagenasa al 0,2 % y se hizo reaccionar con el tejido cortado durante 2 a 3 horas utilizando un agitador a 37 °C, para obtener células procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura.

Las células obtenidas procedentes del tejido de la capa trofoblástica coriónica pura se filtraron con una malla de 70 µm para eliminar el tejido no descompuesto y se les añadió un medio DMEM que incluía suero fetal bovino y antibióticos, y a continuación se centrifugaron durante 4 min a 25 °C y 1000 rpm. Se retiró el sobrenadante, se añadió medio DMEM que incluía suero fetal bovino y antibióticos sin factor de crecimiento a las células precipitadas restantes, y las células se cultivaron en condiciones de 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura se obtuvieron seleccionando las células del cultivo unidas al fondo del recipiente de cultivo.

#### **Ejemplo comparativo 1: Preparación de células madre procedentes de placenta completa**

Se trituró y se lavó el tejido placentario completo con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar la sangre y las células sanguíneas del tejido de la placenta. Al tejido placentario lavado se le añadió un medio DMEM que incluía colagenasa al 0,2 %, y se hizo reaccionar utilizando un agitador a 37 °C para obtener células de placenta. Las células de placenta obtenidas se filtraron con una malla de 70 µm para eliminar el tejido no degradado y se les añadió un medio DMEM que incluía suero fetal bovino y antibióticos, y a continuación se centrifugaron durante 4 min

a 25 °C y 1000 rpm. Se retiró el sobrenadante, se añadió medio DMEM que incluía suero fetal bovino y antibióticos sin factor de crecimiento a las células precipitadas restantes, y las células se cultivaron en condiciones de 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células madre procedentes de la placenta (Pla) completa se obtuvieron seleccionando las células del cultivo unidas al fondo del recipiente de cultivo.

5 **Ejemplo 2: Subcultivo de células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de tejidos de la placenta**

10 Las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura que formaba parte de los tejidos de la placenta obtenidas en el Ejemplo 1, se lavaron con PBS y se cultivaron reemplazando cada 2 a 3 días el medio DMEM que incluía suero fetal bovino y antibióticos sin factor de crecimiento. Cuando las células madre habían crecido un 80 % o más, las células madre se trataron con TryPLE para aislarlas del recipiente de cultivo, y las células madre aisladas se diluyeron en una relación de 1/4 y a continuación se cultivaron en otro recipiente de cultivo para realizar un subcultivo. Mientras se realizaba el subcultivo de forma repetida, se midió el número de pases que no se subcultivaban en absoluto, y se observaron con un microscopio las formas celulares antes del subcultivo (P0) y después del subcultivo prolongado. Además, utilizando las células madre procedentes de la placenta completa (Pla) obtenidas en el Ejemplo Comparativo 1, se realizó el subcultivo mediante el mismo método y después se observaron con un microscopio las formas celulares antes del subcultivo (P0) y después del subcultivo prolongado. Los resultados se ilustran en las FIG. 2 y 3.

20 Como se ilustra en la FIG. 2, se verificó que las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) presentaban una característica morfológica en forma de fibroblasto y una excelente capacidad de proliferación hasta que el número de pases llegó a 28 y, así, era posible el cultivo prolongado.

25 Así mismo, como se ilustra en la FIG. 3, se verificó que las células madre procedentes de la placenta completa (Pla), presentaban una característica morfológica en forma de fibroblasto desde una fase temprana del subcultivo y que se encontraban mezcladas una pluralidad de células que tenían distintas formas en lugar de una forma. Es decir, comparadas con las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) (FIG. 2), en las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) antes y después del subcultivo, solo se mantuvieron específicamente células individuales, pero en las células madre procedentes de la placenta completa, se encontraban mezcladas células que tenían distintas formas.

35 **Ejemplo 3: Análisis de la capacidad de formación de colonias de las células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de tejidos de la placenta**

Se verificó la capacidad de formación de colonias de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura como parte de los tejidos de la placenta obtenidas en el Ejemplo 1. Más particularmente, en las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura obtenidas en el Ejemplo 1, se realizó el primer subcultivo mediante el método del Ejemplo 2, y en el momento en que se completó el subcultivo, las células madre se sembraron a  $5 \times 10^3$  en una placa de 100 mm y después se cultivaron durante 10 días en un medio DMEM que incluía suero fetal bovino y antibióticos sin factor de crecimiento. El número de colonias formadas en las células madre se contó realizando el método de tinción de Giemsa en las células madre cultivadas y se calculó un valor promedio de las mismas. Además, utilizando las células madre procedentes de la placenta completa obtenidas en el Ejemplo Comparativo 1, la capacidad de formación de colonias se midió mediante el mismo método y los valores resultantes de ello se convirtieron al 100 %. Los resultados se ilustran en la FIG. 4.

50 Como se ilustra en la FIG. 4, se verificó que las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) tenían una excelente capacidad de formación de colonias en comparación con las células madre procedentes de la placenta completa.

**Ejemplo 4: Análisis del tiempo de duplicación de la población de las células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de tejidos de la placenta**

55 Se midió el tiempo de duplicación de la población de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura como parte de los tejidos de la placenta obtenidas en el Ejemplo 1. Más particularmente, en las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura obtenidas en el Ejemplo 1, se realizó el primer subcultivo mediante el método del Ejemplo 2 y se obtuvieron células en un intervalo de 2 a 3 días y se repitió el subcultivo. El número de células aumentadas se verificaba cuando se obtenían las células, y durante el subcultivo se cultivaban  $3 \times 10^5$  células en una placa de 100 mm. El tiempo en el que el número de células no aumentaba en absoluto durante el subcultivo se definió como un tiempo en el que finalmente el número de células no aumentaba. El tiempo de duplicación se midió mediante el número de células subcultivadas de P2 a P6 y se calculó como se indica más adelante. Además, utilizando las células madre procedentes de la placenta completa obtenidas en el Ejemplo Comparativo 1, se calculó el tiempo de duplicación de la población mediante el mismo método. Los resultados se ilustran en la FIG. 5.

65 
$$\text{Tiempo de duplicación} = \text{tiempo de cultivo} / \text{duplicación}$$

$$\text{Duplicación} = \log (N_{\text{número inicial de células}} / N_{\text{número aumentado de células}}) / \log 2$$

Como se ilustra en la FIG. 5, se verificó que las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) tenían un tiempo de duplicación de la población corto en comparación con las células madre procedentes de la placenta completa, y que la proliferación celular fue rápida.

5 **Ejemplo 5: Análisis de los marcadores de superficie de las células madre procedentes de una capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de tejidos de la placenta**

10 Para verificar las propiedades inmunitarias de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura como parte de los tejidos de la placenta obtenidas en el Ejemplo 1, se realizó la siguiente prueba. En primer lugar, las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura se lavaron con PBS y se trataron con TryPLE para recoger las células madre, y se centrifugaron durante 4 min a 1000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se añadió una solución mixta de SFB al 2 % y PBS para suprimir la unión no específica y se lavaron las células madre, y a continuación se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm. Después de eliminar el sobrenadante, las células madre se suspendieron en PBS y se separaron  $1 \times 10^5$  células en un matraz redondo destinado al citómetro de flujo. En el  
15 presente documento se añadió un anticuerpo monoclonal antihumano de ratón conjugado con PE, y las células madre se incubaron durante 30 min en hielo y a continuación se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm. Después de eliminar nuevamente el sobrenadante, las células madre se lavaron con PBS y se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm. El procedimiento se repitió dos veces. Por último, después de eliminar el sobrenadante, las células madre se individualizaron y se analizaron las propiedades inmunitarias utilizando un citómetro de flujo (FACS). Además, mediante el mismo método, se analizaron las propiedades inmunitarias de las células madre procedentes de la placenta completa obtenidas en el Ejemplo Comparativo 1. Los resultados se ilustran en la Tabla 1 y en la FIG. 6.

[Tabla 1]

|      | CD31  | CD34  | CD45  | CD73   | CD90   | CD105   | HLA-DR | CD44   |
|------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Pla  | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 97,5 % | 98,0 % | 100,0 % | 0,0 %  | 52,9 % |
| TC-V | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 99,1 % | 98,0 % | 100,0 % | 0,0 %  | 97,0 % |

25 Como se muestra en la Tabla 1 y en la FIG. 6, se verificó que las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) presentaban características de expresión positiva de marcadores para CD44, CD73, CD90 y CD105, y características de expresión negativa de marcadores para CD31, CD34, CD45 y HLA-DR.

30 **Ejemplo 6: Verificación de la capacidad para diferenciarse en condrocitos de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura que forma parte de los tejidos de la placenta**

35 Para verificar la diferenciación en condrocitos de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura que formaba parte de los tejidos de la placenta obtenidas en el Ejemplo 1, las células madre se cultivaron durante 3 semanas en un medio de diferenciación condrogénica inducida conocido (un medio DMEM que incluía dexametasona 0,1  $\mu$ M, ácido ascórbico 50  $\mu$ g/ml, L-prolina 40  $\mu$ g/ml, TGF- $\beta$ 3 10 ng/ml, BMP-6 500 ng/ml y premezcla de ITS 50 mg/ml) para inducir la diferenciación en condrogénicas. Para medir el grado de diferenciación de las células madre en condrogénicas, se realizó un método de tinción con safranina-O y un método de tinción inmunohistoquímica utilizando colágeno de tipo II de acuerdo con el método conocido existente. Además, mediante el mismo método se midió la diferenciación en condrogénicas de las células madre procedentes de la placenta completa obtenidas en el  
40 Ejemplo Comparativo 1. Los resultados se ilustraron en las FIG. 7 a 9.

45 Como se ilustra en las FIG. 7 a 9, se verificó que las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura (TC-V) tenían una excelente capacidad de diferenciación en condrogénicas, que pueden diferenciarse uniformemente en condrocitos en comparación con las células madre procedentes de la placenta completa.

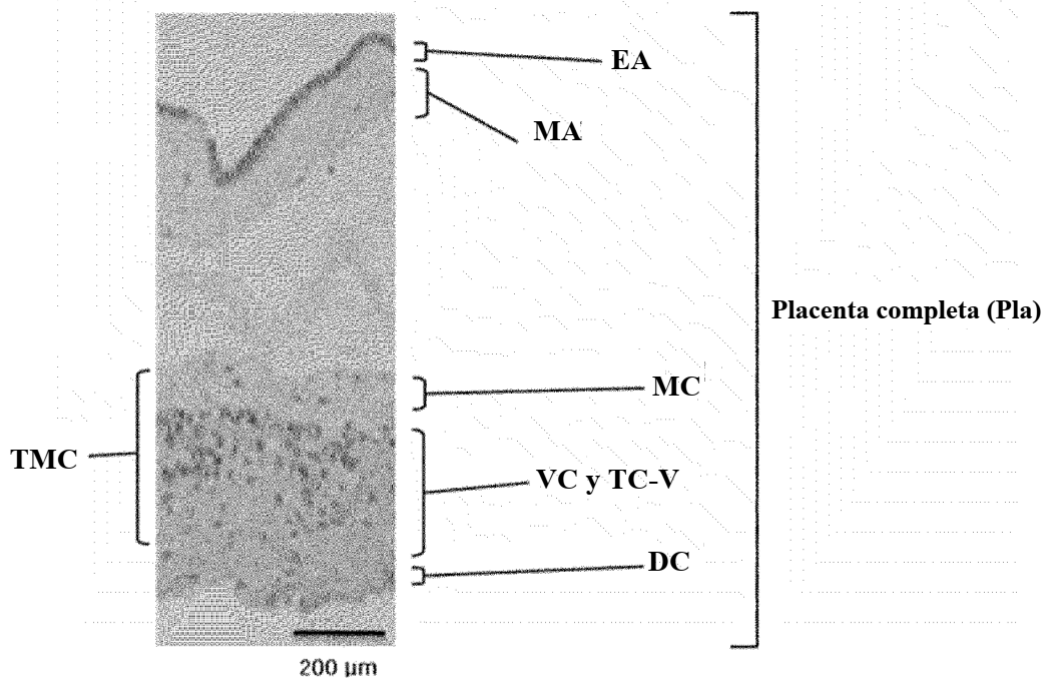
50 En particular, al comparar y analizar las actividades de las diferenciaciones de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura y las células madre procedentes de la placenta completa en osteogénicas, condrogénicas o adipogénicas de acuerdo con el método conocido existente, los grados de las diferenciaciones de las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura en adipogénicas u osteogénicas fueron similares a los de las células madre procedentes de la placenta completa, pero la diferenciación en condrogénicas fue particularmente excelente (véase la Figura 10).

55 Como resultado, en las células madre procedentes de la placenta completa, las células madre que tienen patrones diferenciados distintos procedentes de diversos tejidos están mezcladas y, por tanto, es ligeramente insuficiente para tener un efecto de tratamiento celular deseado. Sin embargo, en el caso de utilizar las células madre procedentes de la capa trofoblástica coriónica pura, únicamente pueden utilizarse las células que tienen características uniformes, la diferenciación en condrogénicas es excelente y, cuando las células madre se aplican como agente terapéutico celular  
60 del daño del cartílago o de enfermedades que precisan regeneración del cartílago, las células madre tienen un efecto excelente.

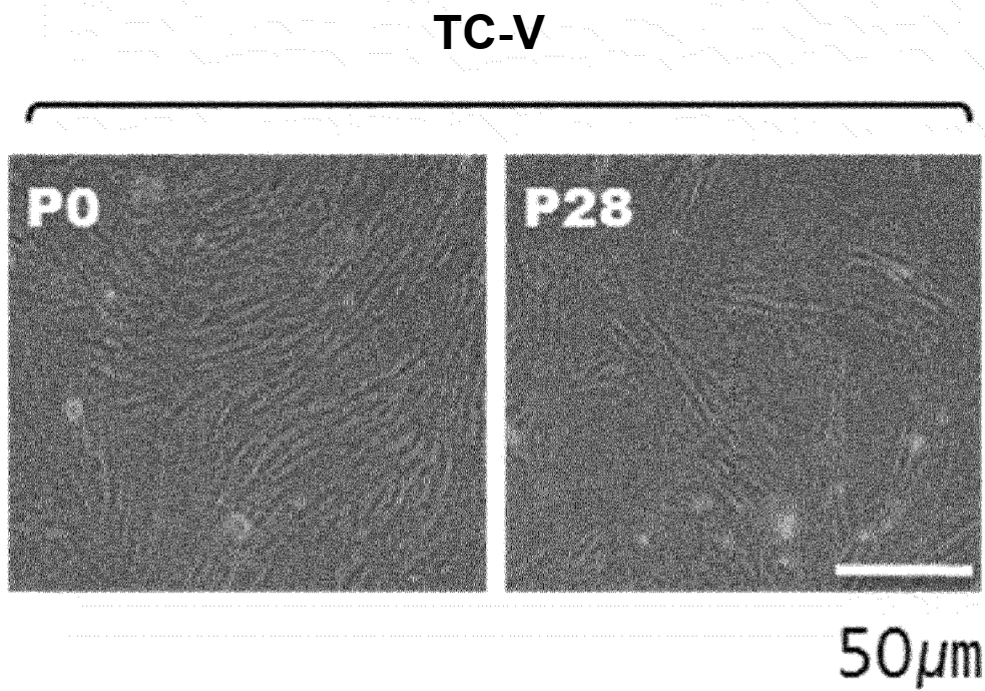
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método *in vitro* o *ex vivo* para la preparación de células madre; caracterizado por que comprende una etapa de aislamiento de las células madre a partir de una capa trofoblástica coriónica aislada sin vellosidades.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre aisladas son positivas para los marcadores de superficie CD44, CD73, CD90 y CD105.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre aisladas son negativas para los marcadores de superficie CD31, CD34, CD45 y HLA-DR.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la capa trofoblástica coriónica sin vellosidades está situada entre una membrana coriónica y una decidua.
- 15 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células madre se preparan mediante las siguientes etapas:
- 20 (a) aislamiento de una capa trofoblástica coriónica sin vellosidades, que forma parte de los tejidos de la placenta, a partir de la placenta;
- (b) obtención de células procedentes de la capa trofoblástica coriónica sin vellosidades mediante el tratamiento con una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en tripsina, colagenasa, dispasa, ADNasa, ARNasa, proteasa, lipasa, hialuronidasa y elastasa de la capa trofoblástica coriónica aislada sin tejido de vellosidades; y
- 25 (c) selección de las células madre a partir de las células obtenidas procedentes de la capa trofoblástica coriónica sin vellosidades.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre tienen la capacidad de diferenciarse en células condrogénicas, adipogénicas, osteogénicas, neuronas, de ligamento y tenocitos.
- 30 7. Un método *in vitro* o *ex vivo* de diferenciación de células madre; caracterizado por que comprende una etapa de aislamiento de células madre a partir de una capa trofoblástica coriónica aislada sin vellosidades y la diferenciación de dichas células madre.
- 35 8. El método de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizado por que el método comprende una etapa de diferenciación de dichas células madre en células condrogénicas, adipogénicas, osteogénicas, neuronas, de ligamento o tenocitos.

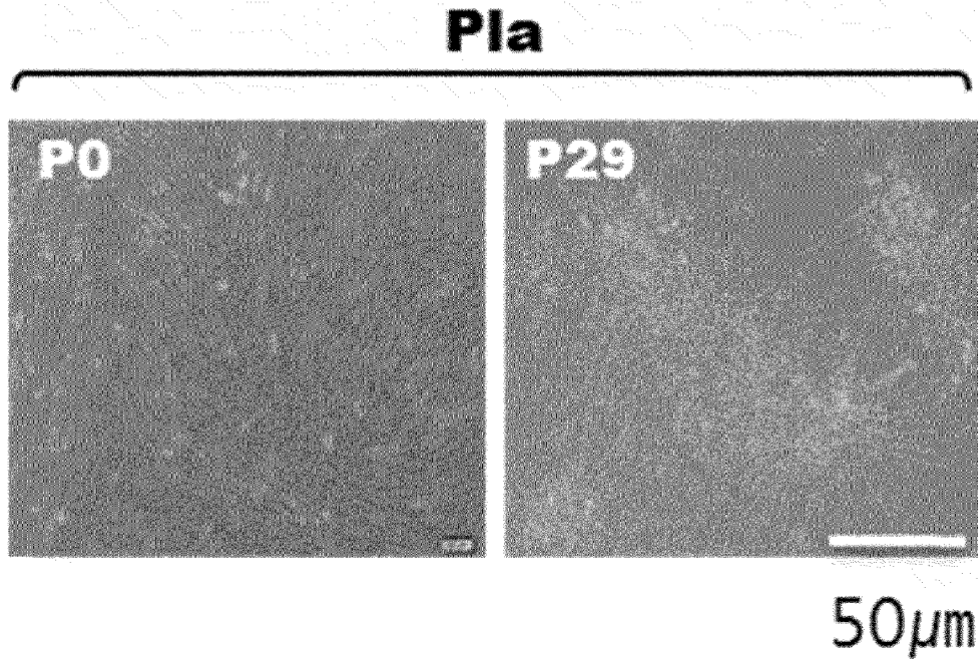
[Fig. 1]



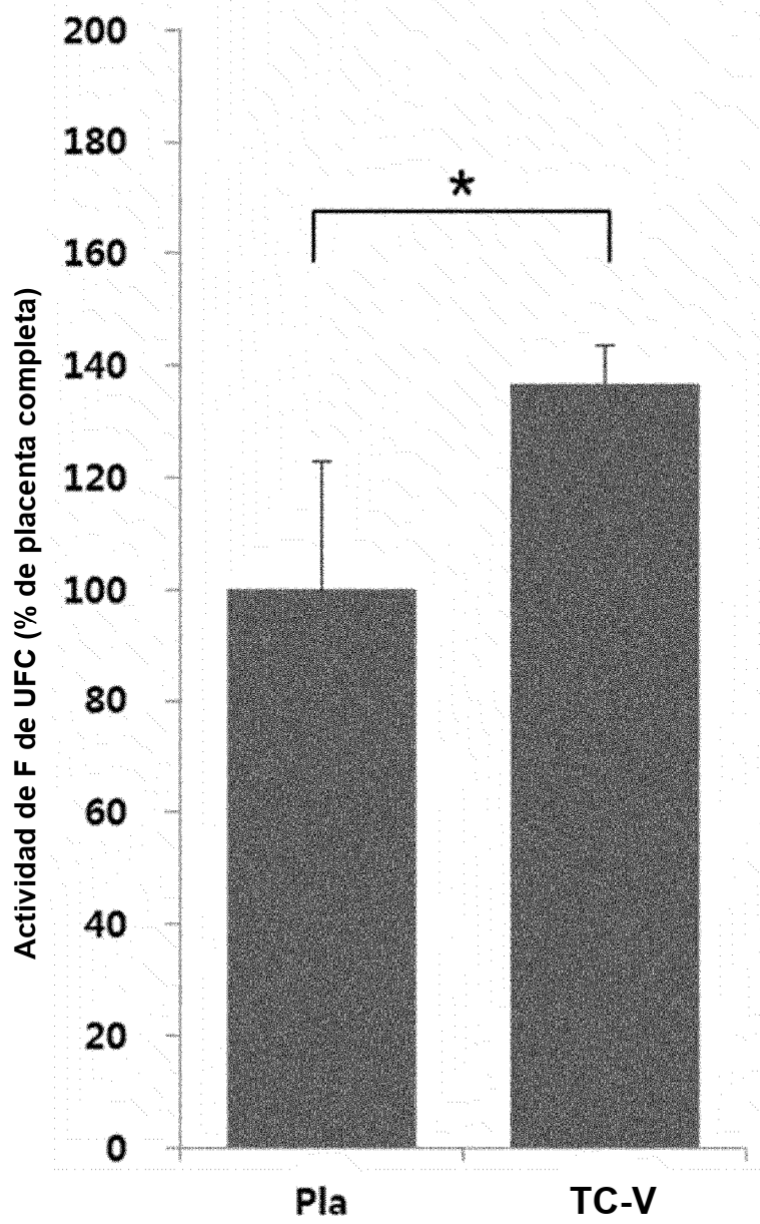
[Fig. 2]



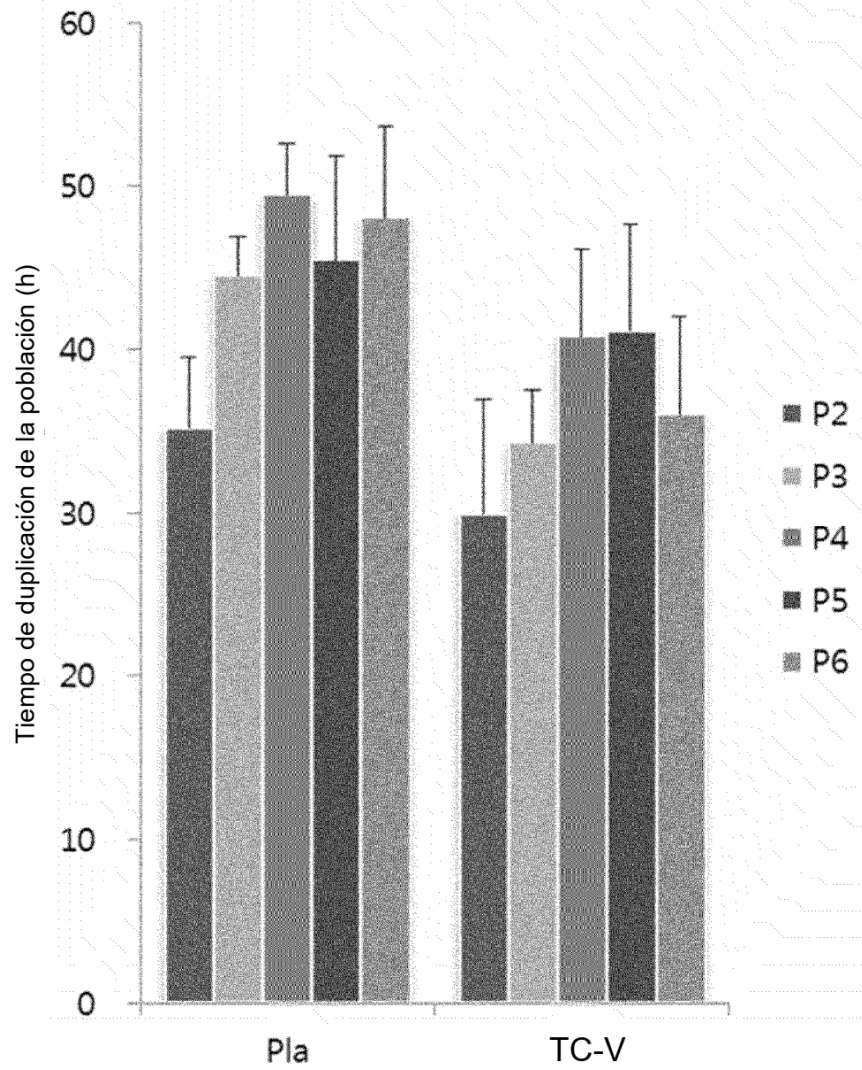
[Fig. 3]



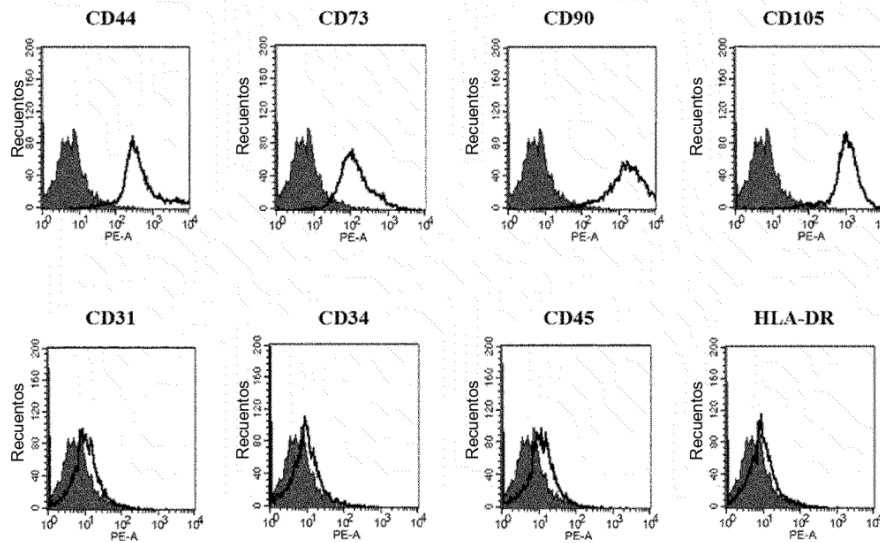
[Fig. 4]



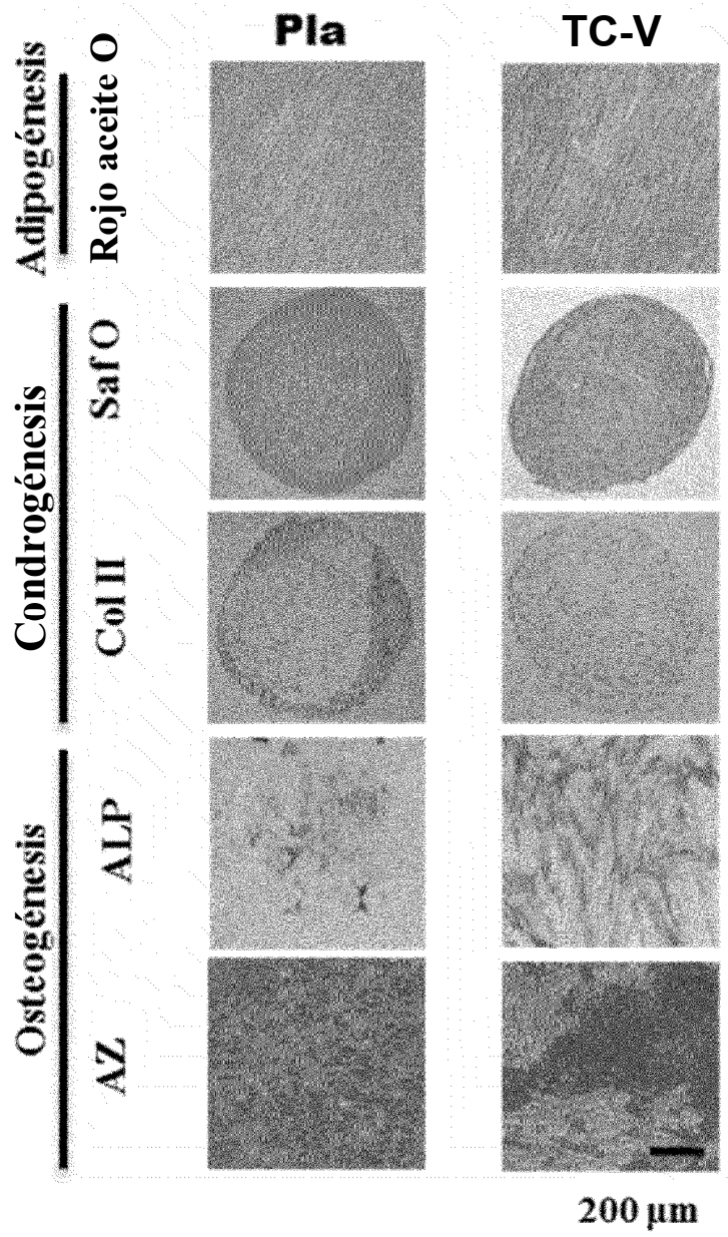
[Fig. 5]



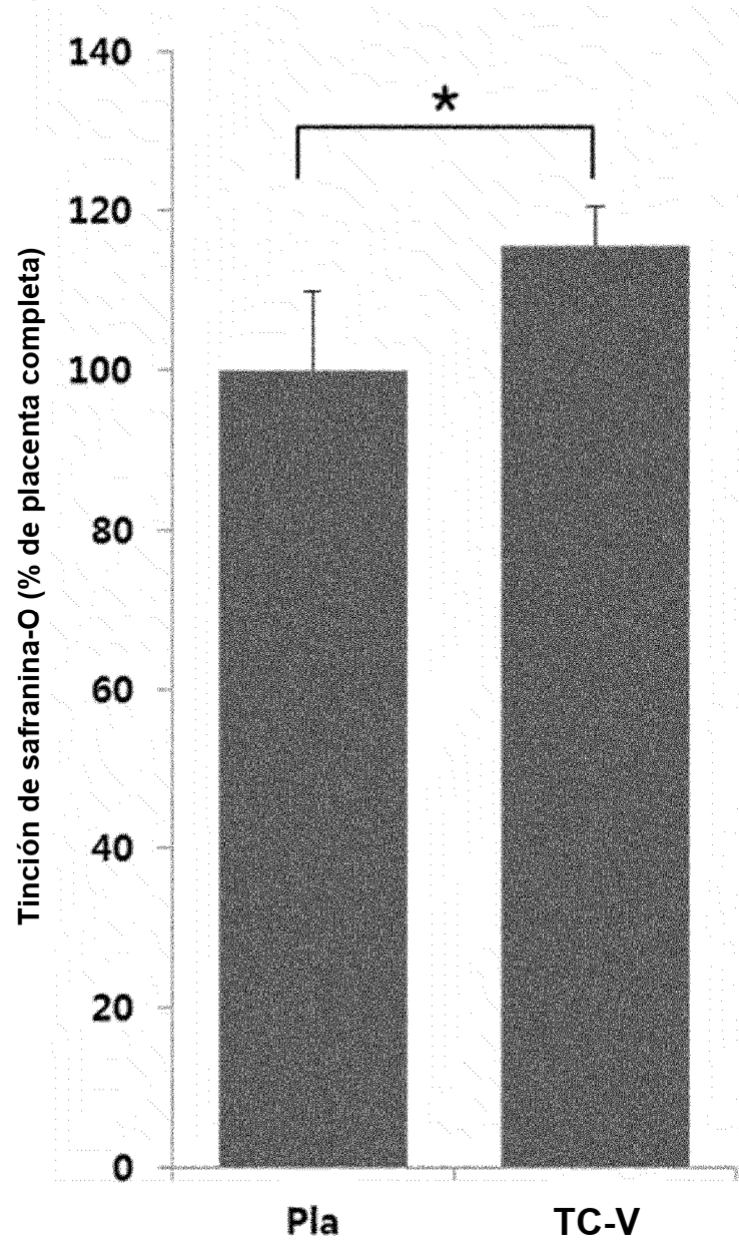
[Fig. 6]



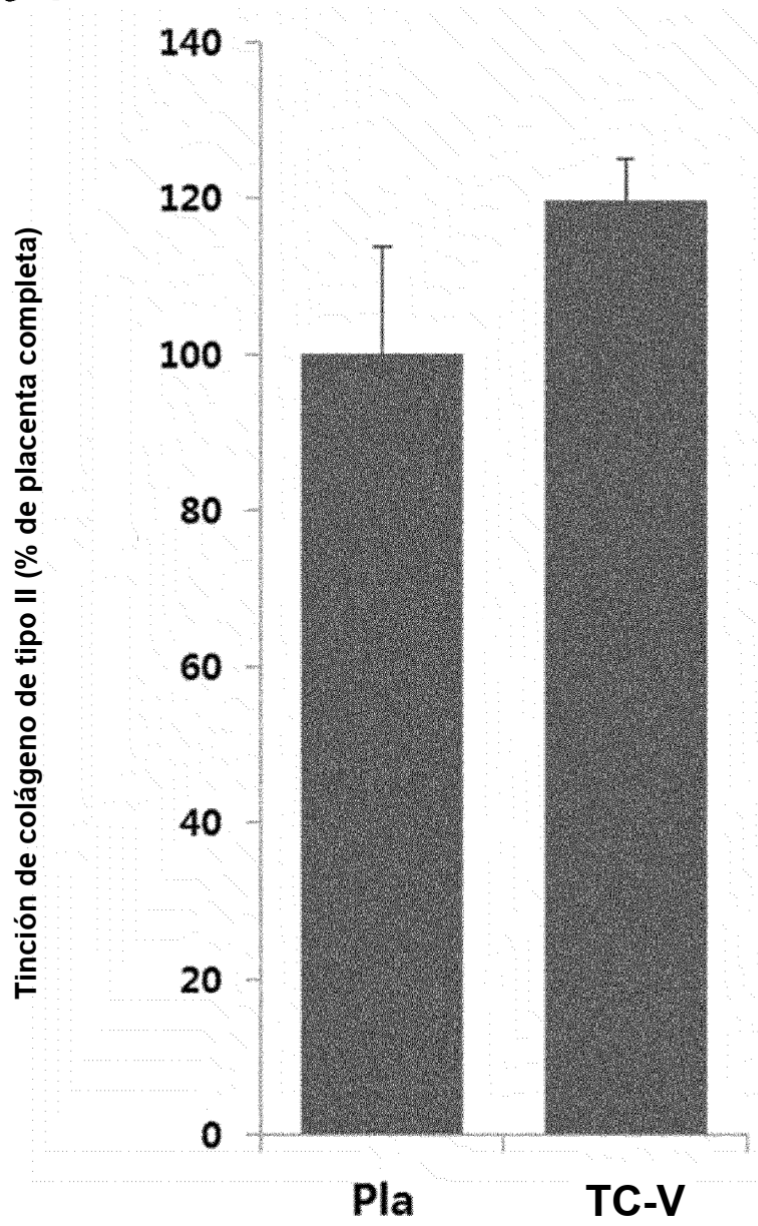
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

