

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 029 385**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)
C12N 1/04 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/077 (2010.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.12.2020 PCT/JP2020/048636**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2021 WO21132539**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.12.2020 E 20905080 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2025 EP 4083186**

(54) Título: **Regulador del crecimiento celular**

(30) Prioridad:

27.12.2019 JP 2019239572

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

24.06.2025

(73) Titular/es:

**BOURBON CORPORATION (100.00%)
3-1 Ekimae 1-chome
Kashiwazaki-shi, Niigata 945-8611, JP**

(72) Inventor/es:

**TAKIZAWA SAKIKO;
FUJIMOTO SHUNSUKE;
TAKASAKA MIEKO y
SASAKI KATSUNORI**

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 029 385 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

Regulador del crecimiento celular

5 Campo técnico

La presente descripción se refiere a un inhibidor de la proliferación celular que comprende ácido glutámico y xilosa, y un método para regular la proliferación de células mediante el uso del mismo.

10 Estado de la técnica

En biología, las células cultivadas se cultivan artificialmente *ex vivo* se usan ampliamente en sistemas experimentales *in vitro*, medicina regenerativa y terapia celular. Para mantener constantes las propiedades de las células, es necesario continuar la proliferación de las células en un medio mediante subcultivo. Sin embargo, 15 cuando las células no establecidas que están limitadas en el número de pasajes (vida útil), tales como las células cultivadas primarias y las líneas celulares finitas, se subcultivan, sus propiedades a menudo cambian.

Por lo tanto, cuando las propiedades de las células cultivadas se mantienen constantes durante un período de 20 medio a largo, las células se conservan comúnmente en crioconservación. Sin embargo, las células que son vulnerables a la congelación y descongelación, tales como las células de primates, se dañan significativamente por la crioconservación.

Además, en los casos de células que tienen una velocidad de proliferación alta y células cultivadas que tienen 25 una velocidad de proliferación baja, el ajuste de la concentración celular a un valor deseado, en el momento de usar las células, es difícil, por lo que se requiere habilidad. También se conoce un método para inhibir la proliferación celular al cambiar temporalmente la temperatura ambiental de las células a una temperatura baja tal como 4 °C, pero el tiempo capaz de inhibir es solo durante varias horas.

Además, entre las células cultivadas, se conoce que las células madre pierden su propiedad no diferenciada 30 (potencia de diferenciación), que es una de las propiedades de las células, tras la subcultivo. Por lo tanto, en el caso de las células ES de ratón, es necesario añadir, por ejemplo, LIF (factor de inhibición de la leucemia) para mantener la propiedad no diferenciada. Además, en el caso de las células ES de primates, es necesario añadir un factor de mantenimiento de la no diferenciación o realizar el cultivo en coexistencia con células alimentadoras (ver el documento JP 2007-228815 A (documento de patente 1)). Sin embargo, muchos de estos factores de mantenimiento de la indiferenciación son costosos, y realizar el cultivo en coexistencia con células alimentadoras es complicado.

Por lo tanto, se demanda un método para regular simplemente la proliferación de una célula mientras se mantienen las propiedades de la célula, sin necesidad de subcultivar la célula, por un medio distinto a la 40 crioconservación.

Como los medios distintos de la crioconservación, por ejemplo, el documento JP 2008-104407 A (documento de patente 2) describe un método para conservar una célula adherente caracterizada porque la célula adherente se conserva en condiciones refrigeradas mediante el uso de un líquido de conservación celular que 45 contiene un azúcar reductor. Este método, sin embargo, requiere necesariamente refrigeración a una temperatura baja, y los tipos de células capaces de conservarse son limitados.

La xilosa es uno de los azúcares constituyentes de las cadenas de azúcar y desempeña un papel importante 50 en el organismo vivo, tal como la comunicación entre células. Además, se sabe que la xilosa está abundantemente contenida en la biomasa leñosa, y se requiere para expandir su uso como un recurso no utilizado en varios campos.

Los presentes divulgadores han confirmado previamente los efectos de varios sacáridos (glucosa, xilosa, galactosa, etc.) en las células ES de ratón, y han informado la posibilidad de que la xilosa pueda mantener la indiferenciación de las células ES de ratón (Tadayuki YOKOYAMA y otros, "Proliferation of mouse ES cells in environments containing various sugars and effect on EB formation," Proceedings of The 7th Congress of Japanese Society for Regenerative Medicine, Vol. 7, p. 239, 2008 (documento no patente 1) y Tadayuki YOKOYAMA y otros, "Reviews on effectiveness in maintaining undifferentiation of mouse ES cells in xylose-containing environments," Proceedings of The 8th Congress of Japanese Society for Regenerative Medicine, Vol. 8, p. 221, 2009 (documento no patente 2)).

Además, los presentes divulgadores han informado que, a pesar de lo pensado anteriormente, que las células madre pluripotentes, cuando se cultivan en un medio que contiene xilosa en lugar de glucosa contenida en un medio común, no pueden utilizar sacáridos distintos de la glucosa como energía y, por lo tanto, no pueden sobrevivir, es posible mantener la supervivencia de las células madre pluripotentes e inhibir la proliferación de 65

estas a una temperatura de cultivo normal durante un período prolongado que excede una semana (documento no patente 3).

5 Sin embargo, sigue siendo un tema importante proporcionar un método para regular simplemente la proliferación de una amplia variedad de células de primates tales como fibroblastos y células madre mesenquimales mientras se mantienen sus propiedades.

Documentos del estado de la técnica

10 Documentos de patente

Documento de patente 1: JP 2007-228815 A

Documento de patente 2: JP 2008-104407 A

15 Documento de patente 3: JP 6042099 B

Documentos no patentes

20 Documento no patente 1: Tadayuki YOKOYAMA y otros, "Proliferation of mouse ES cells in environments containing various sugars and effect on EB formation," Proceedings of The 7th Congress of Japanese Society for Regenerative Medicine, Vol. 7, p. 239, 2008

25 Documento no patente 2: Tadayuki YOKOYAMA y otros, "Reviews on effectiveness in maintaining undifferentiation of mouse ES cells in xylose-containing environments," Proceedings of The 8th Congress of Japanese Society for Regenerative Medicine, Vol. 8, p. 221, 2009

30 Savaskan y otros. (Oncogene, 2011, vol.30, 43-53) informa sobre el efecto de cistina y glutamato en gliomas malignos. Ghadiri y otros. (RSC Adv., 2014, vol.4, 35332-35343) informa sobre el uso de arcilla silicatada estratificada funcionalizada con aminoácidos, tales como ácido glutámico, para la aplicación de cicatrización de heridas.

Resumen de la invención

35 Los presentes divulgadores han descubierto ahora que, cuando se usa un aminoácido específico como un inhibidor de la proliferación celular, es posible simplemente regular la proliferación de una amplia variedad de células de primates tales como fibroblastos y células madre mesenquimales mientras se mantienen sus propiedades. La presente descripción se basa en tal conocimiento.

40 La presente invención se refiere al uso de ácido glutámico y xilosa para inhibir la proliferación de una célula en un medio de cultivo celular, en donde la célula se selecciona de un fibroblasto humano y una célula madre mesenquimal humana.

45 La presente invención se refiere además a un medio de cultivo celular que comprende 0,5 µM o más de ácido glutámico, xilosa y una célula que se mantiene en el medio, en donde la célula se selecciona de un fibroblasto humano y una célula madre mesenquimal humana.

50 La invención se refiere además a un método para regular la proliferación de células, que comprende mantener la célula mediante el uso de un medio de cultivo celular que comprende 0,5 µM o más de ácido glutámico, xilosa y una célula que se mantiene en el medio, en donde la célula se selecciona de un fibroblasto humano y una célula madre mesenquimal humana.

55 El inhibidor de la proliferación celular de la presente descripción puede usarse para inhibir la proliferación de la célula mientras se mantienen las propiedades de la célula en condiciones de cultivo normales. Además, el inhibidor de la proliferación celular de la presente descripción puede usarse ventajosamente para inhibir la proliferación de las células mientras se inhibe la destrucción de las células. Por lo tanto, el inhibidor de la proliferación celular de la presente descripción es extremadamente útil para la conservación y el mantenimiento de las células durante un corto período, sin necesidad de crioconservación.

60 Además, el método para regular la proliferación de células de acuerdo con la presente descripción es muy simple sin requerir ninguna habilidad, ya que solo se realiza una operación de reemplazo del medio normal con el medio que comprende el inhibidor de la proliferación celular de la presente descripción.

65 Además, en el caso donde las células son células madre pluripotentes, cuando se usa un medio que comprende el inhibidor de la proliferación celular de la presente descripción, es posible mantener la célula madre pluripotente mientras se inhibe la proliferación de la célula y se retiene la propiedad de indiferenciación y la

totipotencia de la célula sin añadir un factor de mantenimiento de la indiferenciación o cultivar la célula en coexistencia de una célula alimentadora. Por lo tanto, es posible mantener incluso una célula madre pluripotente que es vulnerable a la congelación durante un corto período de tiempo mientras se retiene su propiedad no diferenciada y totipotencia, como es el caso de la crioconservación.

5

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra los resultados de la observación microscópica cuando los fibroblastos humanos se cultivaron en medio de mantenimiento celular (medio basal DMEM de xilosa y medio basal DMEM sin glucosa) en el que se ajustó la cantidad de adición de ácido glutámico (imágenes de contraste de fase el día 9 del cultivo, aumento: 100 veces).

La Figura 2 muestra los resultados de la observación microscópica cuando las células madre mesenquimales humanas se cultivaron en medios de mantenimiento celular (medio basal DMEM de xilosa y medio basal DMEM sin glucosa) en los que se ajustó la cantidad de adición de ácido glutámico (imágenes de contraste de fase el día 9 del cultivo, aumento: 100 veces).

La Figura 3 muestra los resultados de la observación microscópica cuando las células madre mesenquimales humanas se cultivaron en medios de mantenimiento celular (medio basal DMEM de xilosa y medio basal DMEM sin glucosa) en el que se añadieron 8 mM de ácido glutámico para ajustar (imágenes de contraste de fase el día 12 del cultivo, aumento: 100 veces).

Descripción detallada de la invención

25 Inhibidor de la proliferación celular

El inhibidor de la proliferación celular de acuerdo con la presente descripción comprende ácido glutámico, como se describió anteriormente.

30 El inhibidor de la proliferación celular comprende ácido glutámico como ingrediente activo. El "ingrediente activo", como se usa en la presente, significa un componente requerido para proporcionar el efecto inhibidor de la proliferación celular, que es un objeto de la presente descripción. El efecto inhibitorio de la proliferación celular significa mantener la supervivencia de las células e inhibir la proliferación de las células. Las células pueden conservarse mediante la inhibición de la proliferación de las células.

35 El inhibidor de la proliferación celular se usa junto con xilosa, como se describió anteriormente.

La xilosa es un monosacárido de pentosa, que se contiene abundantemente en la biomasa leñosa y también se denomina azúcar de madera. La xilosa usada en la presente descripción puede ser D-xilosa naturalmente abundante, o L-xilosa o DL-xilosa preparada sintéticamente. La xilosa usada en la presente descripción es preferentemente D-xilosa.

40 Como se usa en la presente, las células son fibroblastos humanos y células madre mesenquimales humanas. La célula usada en la presente descripción es preferentemente un fibroblasto o una célula madre mesenquimal, ya que las células tienen una propiedad de proliferación extremadamente alta y es necesario retener sus rasgos tales como la propiedad no diferenciada.

45 El fibroblasto es una de las células que constituyen el tejido conectivo e incluye células que producen componentes dérmicos tales como colágeno, elastina y ácido hialurónico.

50 La célula madre mesenquimal es una célula madre somática derivada del tejido mesodérmico (mesénquima). La célula madre mesenquimal es una célula capaz de ejercer la capacidad de diferenciarse en células que pertenecen al sistema mesenquimal, y se espera que se aplique a la medicina regenerativa, tal como la reconstrucción de huesos, vasos sanguíneos y músculos cardíacos. La célula madre mesenquimal puede clasificarse en dependencia del tejido del que se recolecta, y ejemplos de estas incluyen células madre derivadas de médula ósea y células madre derivadas de tejido adiposo.

55 Las células cultivadas primarias usadas en la presente descripción se refieren a células obtenidas mediante el primer sembrado y cultivo de tejidos o células recolectadas de un cuerpo vivo. La línea celular finita usada en la presente descripción significa células subcultivadas que están limitadas en el número de pasajes (vida útil). El inhibidor de la proliferación de la presente descripción puede usarse para mantener y conservar las células cultivadas primarias y las líneas celulares finitas cuyas propiedades cambian fácilmente.

60 Se espera que el inhibidor de la proliferación celular de la presente descripción se use en pruebas de respuesta a sustancias y pruebas clínicas en un estado donde se detiene la actividad biológica.

De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un medio de cultivo celular que comprende los inhibidores de la proliferación celular de la presente descripción, y una célula que se mantiene en el medio, en donde la célula se selecciona de un fibroblasto humano y una célula madre mesenquimal humana.

5 El "medio de cultivo celular" significa un medio de cultivo adecuado para cultivar las células descritas anteriormente o una composición de estas, y permite que un número constante de células sobreviva durante un período constante, mientras retiene las propiedades de las células sin causar ningún daño grave que afecte la supervivencia de las células. El medio de cultivo celular puede estar en forma de polvo o líquido.

10 10 El contenido de ácido glutámico en el medio de cultivo celular puede cambiarse apropiadamente en dependencia, por ejemplo, del tipo de células a cultivar, el propósito del cultivo y el tipo de medio basal. El contenido de ácido glutámico en el medio basal se establece en 0,5 µM o más, por ejemplo, 0,5 µM a 10 mM, con mayor preferencia 0,5 mM a 10 mM, aún más preferentemente 1 a 10 mM, aún más preferentemente 5 mM a 8 mM, incluso aún más preferentemente 8 mM.

15 15

20 Los ejemplos del medio basal incluyen el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), el medio mínimo esencial de Eagle (MEM), el medio mínimo esencial de Eagle modificado con α (α-MEM), el medio F12 de Ham, el medio MCDB, el medio de Fischer y el medio RPMI-1640, en el que la glucosa se reemplaza con xilosa. Se prefiere DMEM.

25 25 El contenido de xilosa en el medio de cultivo celular no está particularmente limitado y puede cambiarse apropiadamente en dependencia, por ejemplo, del tipo de células a cultivar, el propósito del cultivo y el tipo de medio basal. El contenido de xilosa en el medio puede ser igual a la cantidad de glucosa en un medio basal normal, y puede establecerse, por ejemplo, de 0,1 a 10,0 g/l, pero es preferentemente de 0,5 a 10,0 g/l, con mayor preferencia de 0,5 a 5,0 g/l, aún más preferentemente de 0,8 a 5,0 g/l, aún más preferentemente de 0,8 a 3,5 g/l. La presente descripción puede exhibir un efecto suficiente incluso en el caso de un contenido bajo de xilosa en el medio de acuerdo con la presente descripción, pero la xilosa no es tóxica y tiene una excelente solubilidad en agua, y por lo tanto, normalmente, no causa sustancialmente ningún problema incluso si se añade en una gran cantidad.

30 30

35 Además, el medio de cultivo celular se usa preferentemente sin la adición de glucosa, desde el punto de vista de inhibir la proliferación celular debido a la glucosa. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, el medio de cultivo celular está sustancialmente libre de glucosa.

40 40 Cuando la xilosa se introduce en el medio, la xilosa se introduce preferentemente mediante el reemplazo de la glucosa en un medio usado en el cultivo celular convencional con xilosa.

Puede añadirse suero o un sustituto de suero o cualquier otro componente al medio, según sea necesario. Puede usarse cualquier suero o sustituto de suero conocido. Los ejemplos de suero incluyen FBS y FCS, y los ejemplos de sustituto de suero incluyen KSR.

45 Los ejemplos del otro componente incluyen aminoácidos no esenciales y ajustadores de pH.

50 50 El suero o sustituto de suero u otro componente que se añadirá al medio es preferentemente uno del que se ha eliminado un sacárido mediante tratamiento de membrana. El tratamiento de membrana puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de una membrana de diáfiltración 36/32 (fabricada por EIDIA Co., Ltd.).

55 Además, el medio de cultivo celular se usa preferentemente como medio de mantenimiento celular. El "medio de mantenimiento celular" significa un medio de cultivo adecuado para cultivar las células descritas anteriormente o una composición de estas, y permite que un número constante de células sobreviva durante un período constante, mientras retiene la propiedad no diferenciada y pluripotencia de células no diferenciadas y los rasgos de fibroblastos tales como la capacidad de producción de colágeno.

60 60 El medio de mantenimiento celular comprende el inhibidor de la proliferación celular descrito anteriormente, y por lo tanto puede retener las propiedades de las células aunque esté sustancialmente libre de un factor de mantenimiento de la no diferenciación distinto del ácido glutámico y xilosa, que se considera un componente esencial de los medios celulares. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, el medio de la presente descripción comprende el inhibidor de la proliferación celular y está sustancialmente libre de un factor de mantenimiento de la no diferenciación distinto del ácido glutámico y la xilosa. Los ejemplos del factor de mantenimiento no diferenciado distinto del ácido glutámico y xilosa incluyen bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico), LIF y componentes derivados de células alimentadoras.

65 Además, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para regular la proliferación de células, que comprende mantener las células mediante el uso del medio de cultivo celular de acuerdo con la presente descripción.

El "regular la proliferación de células" significa detener la capacidad de proliferación de las células en un momento deseado, mantener la concentración celular sin impartir a la célula ningún daño grave que afecte la supervivencia de las células, y después reiniciar la proliferación de las células en un momento deseado. Específicamente, la proliferación celular puede regularse mediante el reemplazo del medio de mantenimiento celular de la presente descripción con un medio de cultivo celular normal. En dependencia de las células, la velocidad de proliferación después del reinicio de la proliferación puede aumentarse al mismo nivel o a un nivel más alto que el de la cultura normal.

La proliferación de células puede regularse a una temperatura normal de cultivo celular y en condiciones ambientales normales.

El período para inhibir la proliferación de células puede cambiarse apropiadamente en dependencia del tipo de células a cultivar, el propósito del cultivo, el tipo de medio basal, la temperatura de cultivo y similares. Por ejemplo, cuando se usa DMEM en el que la glucosa se reemplaza con xilosa en el medio como medio de mantenimiento celular de la presente descripción y se cultiva en condiciones de cultivo normales, se puede esperar que la proliferación celular se inhiba durante al menos un mes, preferentemente durante al menos 26 días, con mayor preferencia durante al menos 21 días, aún más preferentemente durante al menos 14 días, incluso aún más preferentemente durante al menos 8 días.

El medio de mantenimiento celular puede intercambiarse durante el período de inhibición de la proliferación. El intercambio de medio proporciona la ventaja de retener la propiedad de las células incluso durante el cultivo a largo plazo debido a que los componentes de aminoácidos, proteínas y similares en el medio pueden reponerse.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente descripción se describirá en detalle por medio de ejemplos.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, las unidades y métodos de medición de la presente descripción se ajustan a las disposiciones de las Normas Industriales Japonesas (JIS). A menos que se especifique de cualquier otra manera, las "partes" y "%" significan "partes en masa" y "% en masa", respectivamente, y la temperatura se expresa en grados centígrados.

Prueba de adición de ácido glutámico

(1) Preparación del medio

Los medios basales para el cultivo celular se prepararon para tener las siguientes composiciones.

Medio basal DMEM (en adelante también denominado "con Glc")

(Contenido de glucosa: 1,0 g/l, contenido de xilosa: 0 g/l)

En el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Cell Science & Technology Institute, Inc.), las cantidades de componentes a añadir se ajustaron para alcanzar 10 % en volumen de FBS de diálisis (GE Healthcare), 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation).

Medio de mantenimiento celular

(i) Medio basal de DMEM de xilosa (en adelante también denominado "con Xy")

(Contenido de glucosa: 0 g/l, contenido de xilosa: 1,0 g/l)

En DMEM modificado (M-DMEM, obtenido de Cell Science & Technology Institute, Inc.) en el que la glucosa en el medio basal de DMEM se había reemplazado con D-xilosa, las cantidades de componentes a añadir se ajustaron para alcanzar 10 % en volumen de FBS de diálisis, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) para preparar con Xy.

(ii) Medio basal de DMEM sin glucosa (en adelante también denominado "sin Glc")

(Contenido de glucosa: 0 g/l, contenido de xilosa: 0 g/l)

En DMEM modificado (M-DMEM, obtenido de Cell Science & Technology Institute, Inc.) en el que se había eliminado la glucosa en el medio basal de DMEM, las cantidades de componentes a añadir se ajustaron para alcanzar 10 % en volumen de FBS de diálisis, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) para preparar sin Glc.

(2) Célula

Preparación de fibroblastos humanos

5 Los fibroblastos humanos (núm. de catálogo CC-2511) se cultivaron en un placa de cultivo celular recubierto de gelatina (placa de cultivo de 100 mm, obtenido de SANPLATEC CO., LTD.) a 37 °C en presencia de 5 % CO₂, y usado. Como medio, se usó el medio basal DMEM.

Preparación de células madre mesenquimales humanas

10 Las células madre mesenquimales humanas (fabricadas por Lonza, núm. de catálogo PT-5006) se cultivaron en una placa de cultivo celular (placa de cultivo de 100 mm, obtenido de SANPLATEC CO., LTD.) recubierto con 10 µg/ml de fibronectina (Promocell) a 37 °C en presencia de 5 % CO₂, y usado. Como medio, se usó el medio basal DMEM.

15 (3) Prueba para confirmar el efecto inhibidor de la proliferación celular

Ejemplo 1

20 Después del cultivo celular, las células se recuperaron mediante el uso de una solución de tripsina/EDTA 1 mM al 0,1 % en peso, y se sembraron en una placa de 12 pocillos (obtenida de Corning Co., Ltd.), y se cultivaron durante la noche a 37 °C en presencia de 5 % CO₂ mediante el uso del medio basal DMEM anterior.

25 El medio basal DMEM se reemplazó con el medio de mantenimiento celular deseado, y las células se cultivaron ("Día 0 después del cultivo"). No se realizó intercambio de medio durante el período de cultivo.

Además, se realizó la misma prueba de cultivo como se describió anteriormente excepto que se añadió 1 mM, 5 mM u 8 mM de ácido glutámico al medio basal para el cultivo celular.

30 Observación del estado celular

Las células el día 9 después del cultivo se observaron con un microscopio de contraste de fase (IX71, fabricado por Olympus Corporation, aumento: 100 veces).

35 Los resultados cuando se usaron fibroblastos humanos fueron como se muestra en la Figura 1.

En el medio basal de DMEM con xilosa (con Xy), se observó que el número de células muertas disminuyó y la proliferación celular se inhibió a medida que aumentó la concentración de ácido glutámico. En particular, cuando la concentración de ácido glutámico estuvo en el intervalo de 1 a 8 mM, apenas se observaron células muertas.

También en el medio basal DMEM sin glucosa (sin Glc), se observó que el número de células muertas disminuyó y la proliferación celular se inhibió a medida que aumentó la concentración de ácido glutámico.

45 Los resultados cuando se usaron células madre mesenquimales humanas fueron como se muestra en la Figura 2, y se observó la misma tendencia que cuando se usaron fibroblastos humanos.

En el medio basal de DMEM con xilosa (con Xy), se observó que el número de células muertas disminuyó y la proliferación celular se inhibió a medida que aumentó la concentración de ácido glutámico. En particular, cuando la concentración de ácido glutámico estuvo en el intervalo de 5 a 8 mM, apenas se observaron células muertas.

También en el medio basal DMEM sin glucosa (sin Glc), se observó que el número de células muertas disminuyó y la proliferación celular se inhibió a medida que aumentó la concentración de ácido glutámico.

55 Se observó que el estado de la célula era mejor y el número de células muertas era significativamente pequeño en con Xy en comparación con sin Glc.

60 Como prueba de control, se usó el medio basal DMEM en lugar del medio de mantenimiento celular para realizar la prueba de confirmación del efecto inhibitorio de la proliferación celular en los mismos procedimientos como se describió anteriormente. Como resultado, la proliferación celular se confirmó mientras que la muerte celular apenas se confirmó, en cualquier caso en el que se usaron fibroblastos humanos o células madre mesenquimales humanas.

65 Ejemplo 2

Se realizó la misma prueba de cultivo que en el Ejemplo 1, excepto que el medio se intercambió cada tres días durante el período de cultivo.

5 Las Tablas 1 a 2 indican el número de células para cada día de cultivo. La Tabla 1 muestra los resultados de usar los fibroblastos humanos, y la Tabla 2 muestra los resultados de usar las células madre mesenquimales humanas. Tenga en cuenta que el número de células es un promedio de los números de recuentos de células en tres pocillos, y el recuento se mide mediante el siguiente método.

10 Despues de eliminar el sobrenadante de cultivo de las células mediante succión y lavar las células mediante el uso de PBS, las células se desprendieron mediante el uso de una solución de tripsina al 0,1 %/EDTA 1 mM (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation). La reacción de la solución liberadora se detuvo mediante la adición del medio y se recuperaron las células. Y despues, el recuento de células se realizó mediante el uso del Contador de células automatizado CountessTMII (Thermo Fisher Scientific).

15 [Tabla 1]

Fibroblasto humano		Número de células (x 10 ⁵ células/cm ²)			
Días de cultivo		Día 0	Día 6	Día 12	Día 18
20	Medio: con Glc	0,07	0,65	1,39	1,57
	Medio: con Glc Ácido glutámico: 8 mM	0,07	0,56	1,46	1,72
25	Medio: con Xy Ácido glutámico: 8 mM	0,07	0,37	1,13	1,28
	Medio: sin Glc Ácido glutámico: 8 mM	0,07	0,27	0,08	-

30 A partir de la Tabla 1, en los fibroblastos humanos, fue posible confirmar que la proliferación celular se inhibió hasta 6 días después mediante la adición del ácido glutámico en comparación con la prueba de control con medio con Glc. Además, cuando se usó medio con Xy en lugar de medio con Glc, el efecto inhibitorio de la proliferación celular fue notable, y fue posible inhibir la proliferación celular durante un período más largo. Por otro lado, cuando se usó medio sin Glc en lugar de medio con Glc, el número de células después de 12 días fue notablemente menor, y las células muertas ocurrieron, a diferencia del medio con Xy.

40 [Tabla 2]

Célula madre mesenquimal humana		Número de células (*10 ⁴ células/cm ²)						
Días de cultivo		Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18
45	Medio: con Glc	0,356	1,16	3,32	3,26	3,78	5,53	6,23
	Medio: con Glc Ácido glutámico: 8 mM	0,356	1,12	2,96	3,23	3,75	4,46	5,37
50	Medio: con Xy Ácido glutámico: 8 mM	0,356	0,855	0,998	1,65	1,87	2,77	3,90
	Medio: sin Glc Ácido glutámico: 8 mM	0,356	0,591	0,662	1,06	1,04	1,50	1,58

55 A partir de la Tabla 2, en las células madre mesenquimales humanas, fue posible inhibir la proliferación celular hasta 18 días después mediante la adición de ácido glutámico en comparación con la prueba de control con medio con Glc. Además, al igual que en los fibroblastos humanos, cuando se usó medio con Xy en lugar de medio con Glc, el efecto inhibitorio de la proliferación celular fue notable. Además, cuando se usó medio sin Glc en lugar de medio con Glc, como se muestra en la Figura 3, la relación de blanqueamiento alrededor de las células fue grande, y las condiciones de las células se deterioraron, a diferencia del medio con Xy.

60 El inhibidor de la proliferación celular de la presente descripción que comprende ácido glutámico puede inhibir la proliferación de las células. El inhibidor de la proliferación celular de la presente descripción puede inhibir notablemente la proliferación de las células e inhibir la proliferación de las células durante un período más largo mediante el uso junto con xilosa.

ES 3 029 385 T3

En consecuencia, el inhibidor de la proliferación celular de la presente descripción es extremadamente útil para la conservación y el mantenimiento de las células durante un corto período, sin necesidad de crioconservación.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de ácido glutámico y xilosa para inhibir la proliferación de una célula en un medio de cultivo celular, en donde la célula se selecciona de un fibroblasto humano y una célula madre mesenquimal humana.

10 2. Un medio de cultivo celular, que comprende 0,5 µM o más de ácido glutámico, xilosa y una célula que se mantiene en el medio, en donde la célula se selecciona de un fibroblasto humano y una célula madre mesenquimal humana.

15 3. El medio de cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el medio comprende de 0,1 a 10,0 g/l de xilosa.

20 4. Un método para regular la proliferación de células, que comprende mantener una célula mediante el uso de un medio de cultivo celular, que comprende 0,5 µM o más de ácido glutámico, xilosa y la célula que se mantiene en el medio, en donde la célula se selecciona de un fibroblasto humano y una célula madre mesenquimal humana.

25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el medio de cultivo celular comprende de 0,1 a 10,0 g/l de xilosa.

30

35

40

45

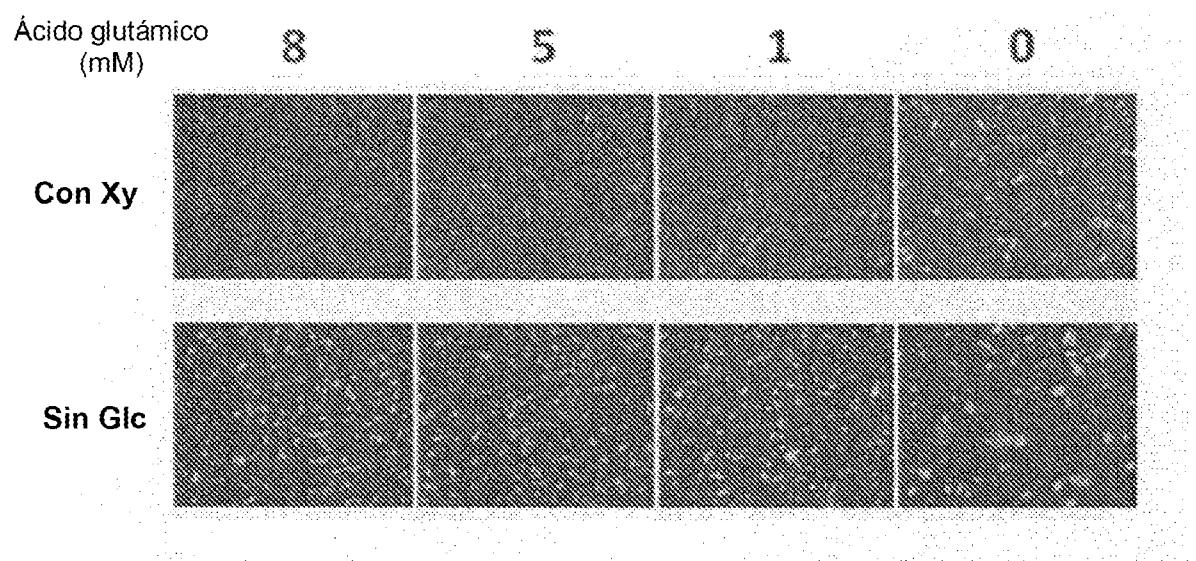
50

55

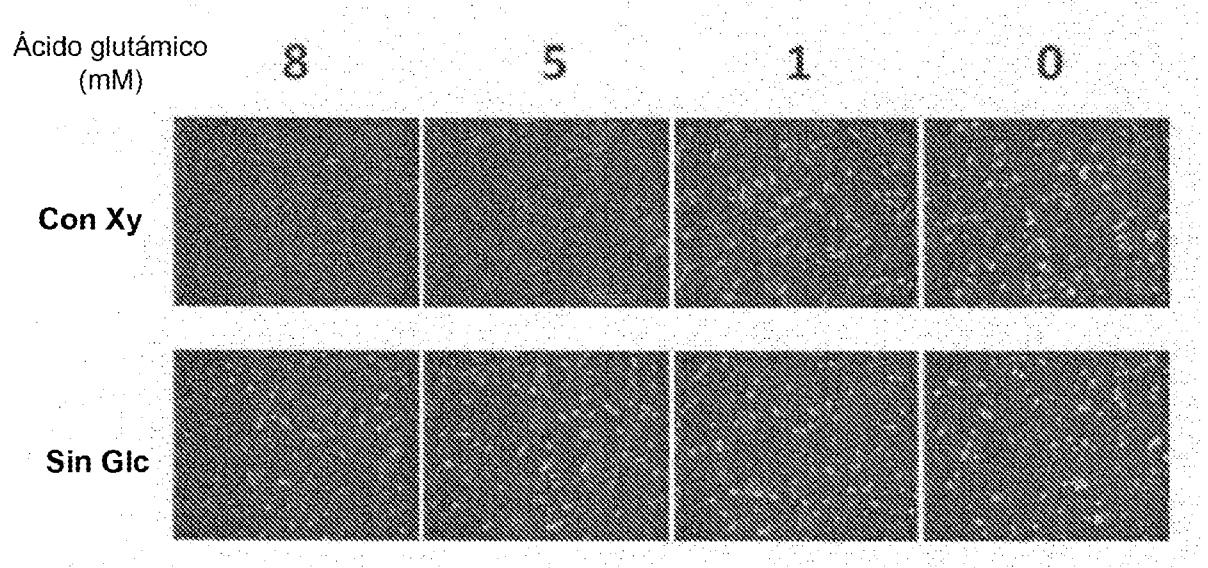
60

65

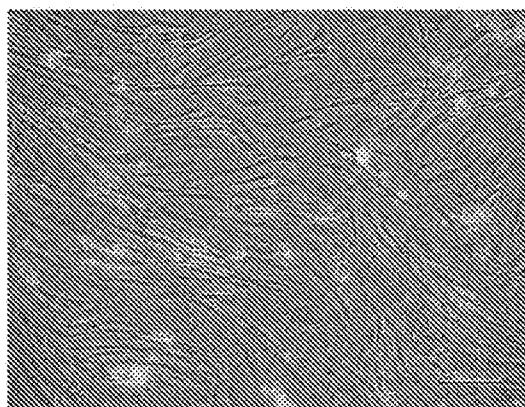
[Figura 1]



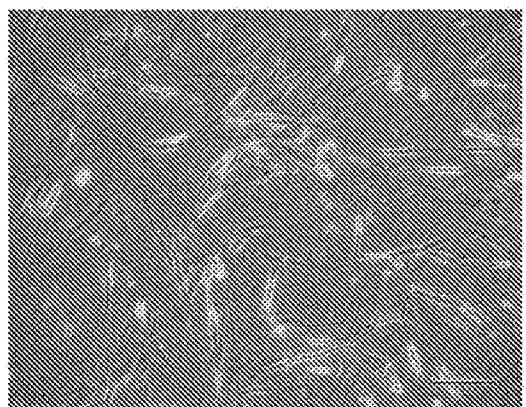
[Figura 2]



[Figura 3]



Con Xy



Sin Glc