



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 447**

51 Int. Cl.:
C12N 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03705473 .1**

86 Fecha de presentación : **19.02.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1483371**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.2004**

54

Título: **Métodos de aislamiento y expansión del cultivo de células troncales/madre mesenquimatosas a partir de sangre del cordón umbilical, y método de diferenciación de células troncales/madre mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical en diversos tejidos mesenquimatosos.**

30

Prioridad: **19.02.2002 KR 10-2002-0008639**

73

Titular/es: **Medipost, Co., Ltd.**
1571-17 Seocho 3-dong
Seocho-gu 137-070 Seoul, KR

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

72

Inventor/es: **Ha, Chul-Won;**
Yang, Yoon-Sun y
Yang, Sung-Eun

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 287 447 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

Métodos de aislamiento y expansión del cultivo de células troncales/madre mesenquimatosas a partir de sangre del cordón umbilical, y método de diferenciación de células troncales/madre mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical en diversos tejidos mesenquimatosos.

Antecedentes de la invención

Campo técnico

La presente invención se relaciona con un método para el aislamiento y cultivo de células troncales/madres mesenquimatosas a partir de sangre del cordón umbilical, y un método para la diferenciación de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical en diversos tejidos mesenquimatosos.

Antecedentes del oficio

Según los métodos de tratamiento para tejidos y órganos dañados por enfermedad crónica y cáncer, existen principalmente dos opciones terapéuticas tales como medicación de un medicamento y operación quirúrgica. Sin embargo, estas técnicas tienen problemas en que son, en su mayoría, solo un tratamiento sintomático para mitigar únicamente los síntomas, a menudo causa complicaciones quirúrgicas, e impone una carga económica significante en un tratamiento a largo plazo.

Recientemente, como un expediente para tratar los tejidos y los órganos dañados, que vencen los problemas anteriores y pueden mostrar un efecto más excelente del tratamiento, existe una nueva atención para un método que usa las células capaces de ser autorenovables y diferenciando como una fuente de transplante para tejidos y órganos dañados.

Ejemplos típicos de tales células incluyen células troncales mesenquimatosas, células madre, y células madre hematopoyéticas. Las células madre hematopoyéticas se diferencian en las células sanguíneas intravasculares incluyendo glóbulos rojos, leucocitos, y plaquetas, mientras que las células troncales/madres mesenquimatosas son células troncales multipotentes que se pueden diferenciar en diversas células.

Las células troncales/madres mesenquimatosas se pueden diferenciar en diversas células y tejidos que constituyen el cuerpo humano, incluyendo células de estroma de la médula, condrocitos, osteoblastos, adipocitos, miocitos, tenocitos, células del ligamento, y células nerviosas. Por consiguiente, se resaltan como las células más importantes en vista del uso práctico de la medicina regenerativa.

Hasta ahora, la médula ósea es la principal fuente de las células troncales/madres mesenquimatosas.

La médula ósea es rica en células troncales/madres mesenquimatosas, pero la recolección de la médula ósea es una técnica invasiva incluyendo el pinchazo muchas veces con una aguja de biopsia y de esta manera tiene una dificultad en el uso práctico. Adicionalmente, la recolección de la médula ósea requiere de anestesia general bajo una operación quirúrgica así que esta da un paciente sintomático con agobio mental y físico y también dolor sintomático en una operación quirúrgica. Debido a las dificultades en este proceso de recolección, la construcción de infraestructura incluyendo un banco de almacenamiento de la médula ósea es imposible.

Por otra parte, la recolección de sangre del cordón umbilical se puede conducir simplemente después del parto y no causa ninguna lesión a la madre, ni al bebe y de esta manera tiene una alta posibilidad de uso práctico. Por otra parte, el almacenamiento y tener el depósito de la sangre del cordón umbilical se hace tan general y activa el progreso al público, así es fácil buscar un donante.

La sangre del cordón umbilical es una buena fuente de células madre hematopoyéticas, y el transplante de las células madre hematopoyéticas utilizando la sangre del cordón umbilical se activa clínicamente. Sin embargo, dado que no se admite todavía, si la sangre del cordón umbilical puede ser una buena fuente de las células troncales/madres mesenquimatosas, la presente invención aspira a proporcionar una técnica para el aislamiento y cultivo de las células troncales/madres mesenquimatosas a partir de la sangre del cordón umbilical y para demostrar las características de las células derivadas de la sangre del cordón umbilical, como las células troncales/madres mesenquimatosas.

Las técnicas de obtención de las células troncales/madres mesenquimatosas a partir de la sangre del cordón umbilical deben ser consideradas que son capaces de aislar y de cultivar solamente las células troncales/madres mesenquimatosas mientras que mantienen una pureza alta y excelente viabilidad de las células, puesto que varias células incluyendo células sanguíneas hematopoyéticas están presentes en las células del cordón umbilical, y las células troncales/madres mesenquimatosas están solamente en una porción muy pequeña de estas.

Según la técnica para el aislamiento y cultivo de las células troncales/madres mesenquimatosas, se utiliza principalmente la centrifugación Ficoll-Hypaque. Sin embargo, esta técnica tiene un problema en permitir que solo los leucocitos entre varias células presentes en la sangre del cordón umbilical sean extraídos así que las células troncales/madres mesenquimatosas disponibles sustancialmente entre las células aisladas son muy pocas en su número y también se afectan por otras células durante la subcultivación, por consiguiente reduciendo su viabilidad.

Debido a esta reducción en número y calidad de estas células, la inducción de diferenciación de estas células en los tejidos mesenquimatosos no se logra bien, y no se establecen, las condiciones para la diferenciación de estas células en ciertos tejidos.

5 Por consiguiente, existe la necesidad de un método para el aislamiento y cultivo eficientes de las células troncales/madre mesenquimatosas a partir de la sangre del cordón umbilical, y un método para la diferenciación de estas células en los tejidos mesenquimatosos.

10 La presente invención aspira a proporcionar un método para aislar y cultivar las células troncales/madre mesenquimatosas eficientemente a partir de la sangre del cordón umbilical a través de una reacción antígeno-anticuerpo utilizando anticuerpos relacionados célula troncal/madre mesenquimatosas, y también proporcionar un método para la diferenciación de estas células en los tejidos mesenquimatosos.

15 **Divulgación de la invención**

La presente invención proporciona un método para el aislamiento y cultivo de las células troncales/madres mesenquimatosas a partir de la sangre del cordón umbilical.

20 El método de aislamiento y cultivo de células de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de: Verter la sangre del cordón umbilical en solución Ficoll-Hypaque; centrifugar la sangre del cordón umbilical en la solución Ficoll-Hypaque para obtener células mononucleares; hacer reaccionar las células obtenidas por cultivo monocapa de las células mononucleares con anticuerpos contra antígenos específicos de células troncales/madres mesenquimatosas por un predeterminado periodo de tiempo de incubación; aislar solo las células unidas a sus anticuerpos correspondientes utilizando un clasificador celular; y cultivar las células aisladas.

25 En el método para aislar y cultivar las células troncales/madres mesenquimatosas de acuerdo con la presente invención, la sangre del cordón umbilical se define como la sangre recolectada de la vena umbilical que conecta la placenta a un feto en mamíferos. En el método de aislamiento y cultivo celular de acuerdo con la presente invención, se utiliza preferiblemente, sangre del cordón umbilical humano.

30 La solución Ficoll-Hypaque que se utiliza en el método de aislamiento y cultivo celular de acuerdo con la presente invención preferiblemente tiene una densidad de 1.077 g/ml.

35 Los anticuerpos contra los antígenos relacionados célula troncal/madre mesenquimatosas, que se utilizan en el método de aislamiento y cultivo celular de la presente invención, son uno o más seleccionados de los anticuerpos para antígenos de la superficie celular que se expresan de las células troncales/madres mesenquimatosas. Específicamente, hay uno o más seleccionados de los anticuerpos para CD105, stro-1, SH3 y SH4, y tales anticuerpos preferiblemente se utilizan todos juntos con el fin de incrementar la pureza al máximo.

40 Los anticuerpos para los antígenos relacionados célula troncal/madre mesenquimatosas, que se utilizan en el método de aislamiento y cultivo celular de la presente invención, tienen un marcador apropiado unido a este, que varía de acuerdo con la característica del clasificador celular. Específicamente, cuando un clasificador celular magnético se utiliza, los anticuerpos que tienen una micro perla magnética unida a estos, se utilizan. Cuando se utiliza un FACsorter, allí se utilizan anticuerpos a los cuales, se une un fluorocromo, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC),
45 ficoeritrina (PE), PerCP o similares.

En las células aisladas según lo descrito arriba, estarán presentes solamente las células que expresan los antígenos, i.e., las células troncales/madres mesenquimatosas.

50 En la presente invención, la respuesta inmune entre los antígenos y anticuerpos se utiliza a través del uso de los anticuerpos para los antígenos específicos de células troncales/madre mesenquimatosas según lo descrito arriba, así que solamente las células troncales/madres mesenquimatosas entre varias células presentes en la sangre del cordón umbilical se aíslan y cultivan. De tal manera, se incrementa, el número sustancial de células troncales disponibles.

55 La presente invención proporciona las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de la sangre del cordón umbilical obtenidas por el método de aislamiento y cultivo celular según lo descrito arriba.

60 En la presente invención, las células madre se definen como todas las células madre que se pueden obtener durante la diferenciación de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical en condrocitos y osteoblastos.

65 Las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical tienen características inmunofenotípicas por eso muestran una respuesta positiva a los anticuerpos para los antígenos CD29, CD49e, CD44, CD54, CD 13, CD90, SH2, SH3 y SH4, y muestran una respuesta negativa a los anticuerpos para los antígenos CD45, CD34, CD 14, HLA-DR, CD31, CD51/61, CD49d, CD106, y CD64.

A partir de ahora, la característica inmunofenotípica de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de acuerdo con la presente invención será descrita en detalle.

ES 2 287 447 T3

5 Las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención muestran respuesta negativa para CD45, CD34 y CD14 como antígenos hematopoyéticos y HLA-DR como un antígeno de histocompatibilidad así que pueden minimizar la respuesta de rechazo que es el problema más grande en trasplante de tejido u órgano. De tal manera, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención son útiles como una fuente de células para trasplante alogénico y también como células donantes universales.

10 Las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención muestran una respuesta negativa para CD31 como un antígeno asociado-célula endotelial, y para CD51/61 como un antígeno asociado-osteoclasto.

15 De tal manera, cuando las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención se utilizan en trasplante de tejido, se minimizan los efectos secundarios, que pueden ser causados por la producción de vasos sanguíneos indeseables o la diferenciación de las células en osteoclastos durante la producción de condrocitos y osteoblastos.

20 Las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención muestran una respuesta positiva para CD 29 y CD49e como antígenos asociados-receptor integrin, y una respuesta negativa para CD49d.

25 Las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención muestran una respuesta positiva a CD44 y CD54 como antígenos asociados-receptor matriz, y una respuesta negativa a CD106.

Las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención muestran una respuesta positiva a los anticuerpos para otros antígenos, a saber CD 13 y CD90, y una respuesta negativa a un anticuerpo para un antígeno CD 64.

30 Las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención muestran una respuesta positiva a los anticuerpos para SH2, SH3 y SH4 como antígenos asociados-célula troncal/madre mesenquimatosas, y esta característica inmunofenotípica se mantiene establemente aún después de varios pasajes.

35 Las características inmunofenotípicas de las células inventivas según lo descrito arriba son idénticas a la característica inmunofenotípica de las células troncales/madres mesenquimatosas típicas.

40 Las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención tienen capacidad de auto-renovación bajo una condición apropiada así que pueden continuar expandiendo mientras que no se diferencian en ciertas células o tejidos.

45 Las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención son células originadas de una población más joven que las células originadas de células troncales mesenquimatosas aisladas de tejidos comunes mesenquimatosos incluyendo tejidos de médula, músculo y piel, así que tienen excelente capacidad de diferenciación.

Debido a esta multipotencia, las células de la presente invención se pueden diferenciar en tejidos mesenquimatosos, tales como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos, tenocitos y así sucesivamente, bajo condiciones apropiadas.

50 Específicamente, la presente invención proporciona un método para la diferenciación de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical en las células mesenquimatosas.

55 El método de diferenciación celular de acuerdo con la presente invención comprende el cultivo de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical en medio de diferenciación celular para predeterminados periodos de tiempo bajo condiciones apropiadas, que varían dependiendo de la clase de las células del tejido mesenquimatosos para ser diferenciadas.

60 En el método de diferenciación celular de acuerdo con la presente invención, las células mesenquimatosas pueden ser específicamente condrocitos u osteoblastos. Las composiciones del medio de diferenciación condrogénico y el medio de diferenciación ostogénico que se utilizan en la presente invención se dan en las Tablas 1 y 2 abajo, respectivamente.

65

TABLA 1

Composición del medio de diferenciación condrogénico de acuerdo con la presente invención

| Componentes | | Concentración |
|---------------------------|--------------------------------|------------------|
| TGF- β III | | 10 ng/ml |
| ITS-Plus | Insulina bovina | 6.25 μ g/ml |
| | Transferina | 6.25 μ g/ml. |
| | Ácido selenoso | 5.35 μ g/ml |
| | Ácido linoleico | 1.25 μ g/ml |
| | Albumina de suero bovino (BSA) | 100 μ g/ml |
| Piruvato de sodio | | 100 nM |
| Dexametasona | | 100 nM |
| Ácido ascórbico 2-fosfato | | 50 μ g/ml |
| Prolina | | 40 μ g/ml |

TABLA 2

Composición de medio de diferenciación ostogénico de acuerdo con la presente invención

| Componentes | Concentración |
|---------------------------|---------------|
| Dexametasona | 0.1 μ M |
| β -glicerol fosfato | 10 mM |
| Ácido ascórbico 2-fosfato | 50 μ M |

Los componentes indicados en las Tablas 1 y 2 se utilizan después de adicionar uno seleccionado de los medios de cultivo celular convencionales, incluyendo medio DMEM, α -MEM, McCoy's 5A, medio basal de Eagle, medio CMRL, medio esencial mínimo Glasgow, medio F-12 de Ham, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio L-15 de Liebovitz, medio 1640 RPMI y así sucesivamente. En el caso del medio de diferenciación condrogénico, se utiliza preferiblemente DMEM, y en el caso del medio de diferenciación ostogénico, se utiliza preferiblemente α -MEM.

Adicionalmente, además de los componentes según lo descrito arriba, el medio de diferenciación celular que se utiliza en la presente invención puede adicionalmente contener uno o más auxiliares, si es necesario. Tales auxiliares incluyen un factor de crecimiento, y suero de caballo o humano, y también agentes antibióticos y antihongos, incluyendo penicilina G, sulfato de estreptomycin, anfotericina B, gentamicina y nistatina, los cuales pueden ser adicionados para prevenir la contaminación del microorganismo.

Como evidente de los Ejemplos abajo, de acuerdo con el método de aislamiento y cultivo celular de la presente invención, las células troncales/madres mesenquimatosas con alta pureza y excelente viabilidad se pueden obtener de la sangre del cordón umbilical.

Las células troncales/madres mesenquimatosas de la presente invención se pueden diferenciar en diversos tejidos mesenquimatosos de modo que expresen el colágeno tipo II, colágeno tipo X y genes aggrecan, como marcadores típicos de los condrocitos, bajo medio condrogénico y condiciones apropiadas.

Por otra parte, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención puede expresar genes osteocalcina, osteopontina y fosfatasa alcalina, como marcadores típicos de los osteoblastos, bajo medio osteogénico y condiciones apropiadas, y permite acumulación extracelular de calcio de la misma manera como los osteoblastos.

Como un resultado, el método de aislamiento y cultivo celular de la presente invención puede ser utilizado para la producción de las células troncales/madres mesenquimatosas en masa que son así llamadas células multipotentes. También, mostrará su utilidad de acuerdo con la expansión de un sistema de almacenamiento de sangre del cordón umbilical, que actualmente se conduce activamente por un banco de almacenamiento de sangre del cordón umbilical.

Adicionalmente, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical obtenidas por el método de aislamiento y cultivo celular de la presente invención se puede diferenciar en diversos tejidos, si es necesario. De tal manera, pueden traer un importante desarrollo en el tratamiento de tejidos dañados mesenquimatosos cuya renovación era difícil.

5

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 es un dibujo que muestra una bolsa de recolección que contiene sangre del cordón umbilical recolectada de la vena umbilical;

10

Fig. 2 es un dibujo que muestra las características morfológicas de las células troncales/madre mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de acuerdo con la presente invención;

15

Fig. 3 es un dibujo que muestra el resultado de una prueba para examinar si las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención expresan los antígenos hematopoyéticos y antígenos de histocompatibilidad;

20

Fig. 4 es un dibujo que muestra el resultado de una prueba para examinar si las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención expresan el antígenos asociados-célula endotelial y antígenos asociados-osteoclasto;

25

Fig. 5 es un dibujo que muestra el resultado de una prueba para examinar si las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención expresan antígenos asociados-receptor integrin;

30

Fig. 6 es un dibujo que muestra el resultado de una prueba para examinar si las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención expresan antígenos asociados-receptor matriz;

35

Fig. 7 es un dibujo que muestra el resultado de una prueba para examinar si las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención expresan otros antígenos;

40

Fig. 8 es un dibujo que muestra el resultado de una prueba para examinar si los antígenos superficiales de células troncales/madres mesenquimatosas se expresan en células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención;

45

Fig. 9 es un dibujo que muestra el resultado de inmunotinción para proteínas asociadas-cartílago después de que las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de la sangre del cordón umbilical de la presente invención se diferenciaron en condrocitos;

50

Fig. 10 es un dibujo que muestra el resultado de RT-PCR para genes asociados-cartílago después de que las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención se diferenciaron en condrocitos;

Fig. 11 es un dibujo que muestra el resultado de tinción histoquímica para proteínas asociadas-hueso y sustancias inorgánicas después de que las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención se diferenciaron en osteoblastos; y

Manera adecuada de realizar la invención

55

La presente invención a partir de ahora será descrita además, en detalle por ejemplos. Se debe tener presente que la presente invención no se limita a o por los ejemplos.

Ejemplo 1

60

Aislamiento y cultivo de células troncales/madres mesenquimatosas a partir de sangre del cordón umbilical de acuerdo con la presente invención

1) *Aislamiento y cultivo ex vivo de células troncales/madres mesenquimatosas a partir de sangre del cordón umbilical*

65

La sangre del cordón umbilical se recolectó de una vena umbilical después del parto. En la colección de la sangre del cordón umbilical, después el cordón umbilical se esterilizó suficientemente con alcohol y betadine, la vena umbilical se pinchó con una aguja 16G conectada a una bolsa de recolección de sangre del cordón umbilical que contiene

ES 2 287 447 T3

23 ml de un anticoagulante CDPA-1 tal que la sangre del cordón umbilical se recolectó en la bolsa de recolección por gravedad (ver, Fig. 1).

Después se colocaron 15 ml de Ficoll-Hypaque (densidad: 1.077 g/ml), en un tubo cónico de 50 ml, 25 ml de sangre del cordón umbilical recolectada según lo descrito arriba lentamente se vertió en Ficoll-Hypaque y se centrifugó a 400xg por 40 minutos a temperatura ambiente para formar una capa de célula mononuclear. Después de retirar el sobrenadante, la capa de célula mononuclear se transfirió a un tubo fresco. A las células mononucleares, se le adicionaron, 30 ml de solución salina reguladora fosfato (PBS) que contiene 2% de suero fetal bovino, se centrifugó a 200xg por 10 minutos y se lavó.

Después se repitió el lavado dos veces, la capa de célula mononuclear se adicionó con 30 ml de solución Tris-NH₄Cl, se dejó reposar por 15 minutos, y se centrifugó a 200xg por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar el sobrenadante, la capa de célula mononuclear se adicionó con 30ml de 2% FBS-PBS, se centrifugó a 200xg por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavó.

Después este procedimiento se repitió de nuevo, la capa de célula mononuclear obtenida por extracción del sobrenadante se adicionó con 10 ml de medio basal (medio a-MEM o DMEM) que contiene 10% de FBS y se mezcla bien.

Las células mononucleares aisladas según lo descrito arriba se midieron por su viabilidad y cuenta celular, se introdujeron en un recipiente de cultivo celular junto con medio basal a un número apropiado (5×10^5 a 1×10^6 células/cm²), y luego se incubaron en una cámara de incubación de CO₂ al 5%. Luego, las células se sometieron a cultivo monocapa a 37°C.

La apariencia de una colonia se observó con un microscopio todos los días para examinar si la colonia se une bien y crece en una monocapa en el fondo del recipiente del cultivo.

Después de que las células alcanzaron el 90% de confluencia, el medio se extrajo utilizando una bomba de succión y una pipeta, y luego las células se lavaron con PBS del cual se han eliminado el calcio y el magnesio. Las células lavadas se adicionaron con solución de Tripsina/EDTA al 0.25%, y se dejó reposar por 10 minutos a 37°C en una cámara de incubación de CO₂ al 5%. Las células separadas del recipiente de cultivo celular se recolectaron en un tubo de nuevo, se centrifugaron a 200xg por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron.

Las células lavadas se hicieron reaccionar con anticuerpos contra antígenos específicos de células troncales/madre mesenquimatosas por un periodo de tiempo de incubación dado. Los anticuerpos contra los antígenos específicos de células troncales/madre mesenquimatosas fueron los anticuerpos contra CD105, stro-1, SH3 y SH4, en los cuales cada uno de los anticuerpos tiene una perla magnética o un fluorocromo unido a este, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o PerCP y así sucesivamente.

Después de la reacción con los anticuerpos, las células troncales/madres mesenquimatosas unidas a sus anticuerpos correspondientes se aislaron utilizando un equipo de separación celular tal como clasificador celular magnético o FACsorter.

Las células aisladas según lo descrito arriba se adicionaron con 10ml de medio basal que contiene 10% de FBS, se mezclaron exhaustivamente y se midió su viabilidad y cuenta celular. El medio basal y las células troncales/madre mesenquimatosas de un número apropiado (4 a 5×10^4 células/cm²) se colocaron en placas en un recipiente de cultivo celular, y se cultivaron a 37°C, en una cámara de incubación de CO₂ al 5%.

Después de esto, cuantas veces las células alcanzaron el 100% de confluencia, la subcultivación repetida se condujo de modo que las células troncales/madre mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical se desarrollaron *ex vivo*.

La Fig. 2 muestra las características morfológicas de las células aisladas mediante el método de la presente invención. En la Fig. 2a, las células aisladas por el método inventivo cultivadas en la forma de una forma de huso, como una forma típica de las células troncales/madres mesenquimatosas, y una forma de colonia similar a fibroblasto homogéneo. Como se muestra en la Fig. 2b, las células de la presente invención se tiñeron con Trypan azul y se midió su viabilidad, y los resultados mostraron una viabilidad excelente del 98-99%.

Como un resultado, el método de la presente invención permite un aislamiento y cultivo eficiente de las células troncales/madres mesenquimatosas a partir de la sangre del cordón umbilical.

2) Análisis de las características de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical, obtenidas por la presente invención

Con el fin de examinar si las células derivadas de la sangre del cordón umbilical obtenidas por la presente invención tienen la característica de las células troncales/madres mesenquimatosas, el patrón de expresión de los antígenos de superficie celular de las células obtenidas en 1) del Ejemplo 1 se analizaron como sigue.

ES 2 287 447 T3

Los antígenos cuyos inmunofenotipos se examinan en este Ejemplo fueron CD45, CD34 y CD14 como antígenos hematopoyéticos, HLA-DR como un antígeno de histocompatibilidad, CD31 como un antígeno asociado-célula endotelial, CD51/61 como un antígeno asociado-osteoclasto, CD29, CD49d y CD49e como antígenos asociados-receptor integrin, CD44, CD54 y CD106 como antígenos asociados-receptor matriz, SH2, SH3 y SH4 como antígenos específicos de células troncales/madre mesenquimatosas, y CD 13, CD64 y CD90 como otros antígenos.

2 x 10⁶ células cultivadas en el antedicho 1) se lavaron con solución PBS que contiene 2% de FBS, y se hicieron reaccionar con los anticuerpos correspondientes a los respectivos antígenos a temperatura ambiente. La expresión de los antígenos se examinó utilizando un citómetro de flujo, y los resultados de esto se muestran en las Figs. 3 a 7. Particularmente, la Fig. 3 muestra los resultados para los antígenos hematopoyéticos y los antígenos de histocompatibilidad, la Fig. 4 muestra los resultados para los antígenos asociado-célula endotelial y antígenos asociados-osteoclastos, la Fig. 5 muestra los resultados para los antígenos asociados-receptor integrin, la Fig. 6 muestra los resultados para los antígenos asociados-receptor matriz, y la Fig. 7 muestra los resultados para los otros antígenos.

Como se muestra en la Fig. 3, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención mostraron una respuesta negativa a los anticuerpos para CD45, CD34 y CD14 como antígenos hematopoyéticos, y HLA-DR como un antígeno de histocompatibilidad.

De tal manera, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención son deficientes en los antígenos hematopoyéticos y el antígeno de histocompatibilidad, así que pueden minimizar el rechazo, que es un problema en transplante de tejido.

Como se muestra en la Fig. 4, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención mostraron una respuesta negativa a los anticuerpos para CD31 como un antígeno asociado-célula endotelial, y CD51/61 como un antígeno asociado-osteoclasto.

De tal manera, se puede encontrar que, cuando las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención se utilizan en transplante de tejido, no hay efectos secundarios que se puedan causar por la producción de vasos sanguíneos indeseables y la diferenciación de células en los osteoclastos durante la producción de condrocitos u osteoblastos.

Como se muestra en la Fig. 5, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención mostraron una respuesta positiva a los anticuerpos para CD 29 y CD49e como antígenos asociados-receptor integrin mientras que que muestran una respuesta negativa a un anticuerpo para el antígeno CD49d.

Como se muestra en la Fig. 6, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención mostraron una respuesta positiva a los anticuerpos para CD44 y CD54 como antígenos asociados-receptor matriz mientras que mostraron una respuesta negativa a un anticuerpo para el antígeno CD106.

Como se muestra en la Fig. 7, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención mostraron una respuesta positiva a los anticuerpos para otros antígenos, i.e., CD13 y CD90, mientras que mostraron una respuesta negativa a un anticuerpo para el antígeno CD64.

También, allí se condujo una prueba para examinar si cada uno de los cultivos del primer, quinto, décimo y decimoquinto pasajes de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención expresan SH2, SH3 y SH4 como antígenos superficiales típicos de las células troncales/madres mesenquimatosas. Como un resultado, según se muestra en la Fig. 8, se podría encontrar que las células de la presente invención mostraron una respuesta positiva a estos antígenos, semejante al cultivo del primer pasaje de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de médula ósea, aún después de varios subcultivos, y este inmunofenotipo se conservó establemente aún después de varios pasajes.

Los inmunofenotipos mostrados en las Figs. 3-8 de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención son idénticos a aquellos de las precedentes células troncales/madres mesenquimatosas. Esto sugiere que las células aisladas a partir de la sangre del cordón umbilical, mediante el método de la presente invención tienen excelentes características para las células troncales/madre mesenquimatosas.

Ejemplo 2

Diferenciación de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención en condrocitos

1) Diferenciación de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención en condrocitos

Con el fin de examinar si las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención tienen la característica de diferenciar en los tejidos mesenquimatosos, se indujo la diferenciación de estas células en condrocitos.

ES 2 287 447 T3

El medio utilizado en la diferenciación en los condrocitos tenía la composición dada en la Tabla 1 arriba, y las células se diferenciaron en cultivos en pellet. El medio se reemplazó cada tres días, y las células fueron muestreadas a intervalos una vez a la semana después de la inducción de diferenciación, y sometidas al análisis de expresión de inmunomarcadores y análisis de biología molecular.

2) *Los análisis inmunoquímicos de los tejidos diferenciados condrogénicos*

Después de la diferenciación en los condrocitos, las células de la presente invención se inmunotifieron como sigue con el fin de examinar que expresan el colágeno tipo II, como un antígeno específico-condrocito.

Las muestras de pellet celular recolectadas a intervalos de una semana después de inducir la diferenciación en los condrocitos se incrustaron en parafina, o congelaron y seccionaron con el fin de conservar suficientemente la antigenicidad de los epitopes. Luego, los tejidos en pellet se inmovilizaron sobre portaobjetos a un espesor de 3-5 μm y se inmunotifieron.

Los portaobjetos respectivos se trataron con peróxido de hidrógeno por 5 minutos para eliminar la peroxidasa presente dentro de las células, y luego se trataron con un reactivo que bloquea la proteína por 5 minutos.

Después de esto, se incubaron con anticuerpos monoclonales de rata por 10 minutos. Después del lavado, se trataron con peroxidasa estreptavidina por 10 minutos. A continuación, se trataron con cromógenos para causar una reacción de color, y se contra-tifieron con hematoxilina.

Como un resultado, una semana después de inducir la diferenciación de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención en los condrocitos, se observaron, hallazgos positivos en una porción de los pellets. También, según se muestra en la Fig. 9, tres semanas después de inducir la diferenciación, se observaron, hallazgos positivos en el conjunto de pellets.

Considerando el hecho que las células diferenciadas secretan el colágeno tipo II como un importante componente de la matriz extracelular (ECM) según lo descrito arriba, se cree que las células de la presente invención pueden desempeñar suficientemente las funciones de los condrocitos.

3) *Análisis de biología molecular de los tejidos diferenciados condrogénicos*

Después de inducir la diferenciación de las células inventivas en los condrocitos, se condujo la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) como sigue con el fin de examinar si las células inventivas expresan los genes específicos-condrocito.

Los pellets celulares recolectados a intervalos de una semana después de inducir la diferenciación en los condrocitos se trataron con Trizol R por 5 minutos y se trataron con cloroformo, seguido por centrifugación a 15000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se tomó y adicionó con isopropanol de manera que se precipita el ARN.

En la reacción RT, el ARN obtenido según lo descrito arriba, se mezclaron, 1 μl del cebador oligo d(T), 1 μl solución mezcla dNTP, y agua libre de RNase y se hicieron reaccionar durante 5 minutos a 65°C. Se le adicionaron a esta mezcla, 4 μl de solución reguladora de la reacción RT, 2 μl de DTT y 1 μl del inhibidor RNase y se hicieron reaccionar a 42°C durante 2 minutos. Después de esto, se adicionó transcriptasa reversa a la mezcla y se hizo reaccionar a 42°C por 50 minutos. El cADN obtenido según lo descrito arriba se inactivó a 70°C por 15 minutos y se utilizó como una plantilla PCR.

En la reacción PCR, el colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo X y los genes *aggrecan* se utilizaron como cebadores. Se seleccionó, como un control positivo, un condrocito articular humano, y se seleccionó como un control negativo, un gen GAPDH que siempre se expresa en las células a un nivel constante.

A cada uno de los tubos de reacción, se le adicionaron 5 μl de cADN, cebador, solución de mezcla de dNTP, cloruro de magnesio, 10-veces de la solución reguladora de la reacción PCR, y polimerasa Taq, a la que se esterilizó, se adicionó agua destilada tres veces de tal manera se ajusta un volumen de reacción final de 50 μl . Luego, la reacción PCR se condujo en el volumen de reacción final de 50 μl . La secuencia base de un cebador para cada uno de los genes, y las condiciones de reacción se dan en la Tabla 3 abajo.

TABLA 3

| Genes | Secuencia base de cebadores | composición PCR | Condiciones PCR |
|---------------------|---|--|---|
| GAPDH | 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (adelante, SEQ ID NO: 1) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (reverso, SEQ ID NO: 2) | cADN plantilla: 5µl cebadores: 2.5µl, respectivamente PCR mezcla | Desnaturalización inicial a 94°C por 2min; 35 ciclos de 94°C por 30seg, 60°C por 30seg, y 72°C por 30 seg.; y extensión final a 72°C por 7min. |
| Colágeno Tipo I | 5'-CCCCCTCCCCAGCCACAAAGA-3' (adelante, SEQ ID NO: 3) 5'-TCTTGGTCGGTGGTGGACTCT-3' (reverso, SEQ ID NO: 4) | | Desnaturalización inicial a 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 60°C por 30seg, y 72°C por 30 seg.; y extensión final a 72°C por 7 min |
| Colágeno Tipo II | 5'-TTTCCCAGGTCAAGATGGTC-3' (adelante, SEQ ID NO: 5) 5'-CITCACCACCTGTCfCACCA-3' (reverso, SEQ ID NO: 6) | | Desnaturalización inicial a 94°C por 2min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 55°C por 30seg, y 72°C por 30 seg.; y extensión final a 72°C por 7min. |
| Colágeno Tipo X | 5'-CCCTITITGCFGCTAGTATCC-3' (adelante, SEQ ID NO: 7) 5'- CTGTTGTCCAGGTTTTCTGGCAC- 3' (reverso, SEQ ID NO: 8) | | Desnaturalización inicial a 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 57°C por 30 seg., y 72°C por 30 seg.; y extensión final a 72°C por y extensión final a 72°C por 7 min. |
| Aggrecan | 5'- TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC- 3' (adelante, SEQ ID NO: 9) 5'- GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA- 3' (reverso, SEQ ID NO: 10) | | Desnaturalización inicial a 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30sec, 60°C por 30 seg., y 72°C por 30 seg.; y extensión final a 72°C por 7 min. |

Los productos PCR respectivos se sometieron a electroforesis, y los resultados de estas se muestran en la Fig. 10.

Como se muestra en la Fig. 10, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención expresaron todo el colágeno tipo II, colágeno tipo X y los genes aggrecan de una semana después de inducir su diferenciación en condrocitos.

Particularmente, el nivel de expresión de cada uno de los genes se incrementó además con un tiempo de diferenciación más largo. Cuatro semanas después de inducir la diferenciación, el nivel de expresión de cada uno de los genes fue tan alto como el del condrocito articular humano (designado como "chon" que es el control positivo).

Por otra parte, el nivel de expresión del gen GAPDH como el control negativo fue constante independientemente del tiempo de inducción de diferenciación.

Por consiguiente, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención se pueden diferenciar en los condrocitos bajo condiciones apropiadas.

Ejemplo 3

Diferenciación de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención en osteoblastos

5

1) *Diferenciación de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención en osteoblastos*

10 Con el fin de examinar si las células troncales/madres mesenquimatosas de la presente invención tienen las características de diferenciación en los osteoblastos, se indujo, la diferenciación de las células inventivas en los osteoblastos.

15 El medio utilizado en la diferenciación en los osteoblastos tuvo la composición dada en la Tabla 1 arriba, y las células se diferenciaron en cultivo-monocapa. El medio se reemplazó cada tres días, y las células fueron muestreadas a intervalos de una semana después de inducir la diferenciación, y someter a análisis de expresión de inmunomarcadores y análisis de biología molecular.

2) *Análisis histoquímico de tejidos diferenciados osteogénicos*

20 Después de la diferenciación en los osteoblastos, las células de la presente invención se tiñeron histoquímicamente como sigue con el fin de examinar si expresan fosfatasa alcalina que es un antígeno específico-osteoblasto.

25 Las células, que han sido recolectadas a intervalos de una semana después de inducir la diferenciación en los osteoblastos por cultivo monocapa, se inmovilizaron con metanol y luego se tiñeron histoquímicamente por fosfatasa alcalina como un antígeno específico-osteoblasto. También, con el fin de determinar si el calcio como un componente extracelular, se acumula, las células se examinaron por tinción de von Kossa. Los resultados se muestran en la Fig. 11.

30 Como se muestra en la Fig. 11, a partir de una semana después de inducir la diferenciación de las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención en los osteoblastos, se observaron hallazgos positivos en una porción de los tejidos. Tres a cuatro semanas después de inducir la diferenciación, se observaron hallazgos positivos en los tejidos completos.

Los resultados de la tinción de von Kossa mostraron que la acumulación de calcio extracelular se incrementó gradualmente.

35 Considerando el hecho que las células diferenciadas expresan la fosfatasa alcalina como un componente importante del osteoblasto y permiten la acumulación de calcio extracelular según lo descrito arriba, se cree que las células de la presente invención pueden desempeñar suficientemente las funciones de los osteoblastos.

40 3) *Análisis de biología molecular de tejidos diferenciados osteogénicos*

Después de la diferenciación en los osteoblastos, se condujo el RT-PCR como sigue con el fin de examinar si las células de la presente invención expresan los genes específicos- osteoblasto.

45 Los tejidos recolectados a intervalos de una semana después de la diferenciación en osteoblastos se trataron con Trizol R por 5 minutos y luego se trataron con cloroformo, seguido por centrifugación a 15000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se tomó y adicionó con isopropanol para precipitar el ARN.

50 En la reacción RT, el ARN obtenido según lo descrito arriba, 1 μ l del cebador oligo d(T), 1 μ l de solución mezcla dNTP, y agua libre de RNase se mezclaron y se hicieron reaccionar por 5 minutos a 65°C. A esta mezcla se le adicionaron, 4 μ l de solución reguladora de la reacción RT, 2 μ l de DTT y 1 μ l del inhibidor de RNase y se hicieron reaccionar a 42°C por 2 minutos. Después de esto, la transcriptasa reversa se adicionó a la mezcla y se hicieron reaccionar a 42°C por 50 minutos. El cADN de esta manera obtenida se inactivó a 70°C por 15 minutos y se utiliza como una plantilla PCR.

55 En la reacción PCR, osteocalcina, fosfatasa alcalina osteopontina que son genes específicos-osteoblastos se utilizaron como cebadores. Como un control negativo, se seleccionó, un gen GAPDH que siempre se expresa en las células a un nivel constante.

60 A cada uno de los tubos de reacción se le adicionaron, 5 μ l de cADN, cebador, solución mezcla de dNTP, cloruro de magnesio, 10-veces de solución reguladora reacción PCR, y Taq polimerasa, la cual se esterilizó, se adicionó tres veces agua destilada para ajustar un volumen de reacción final de 50 μ l. Luego, la reacción PCR se condujo en el volumen de reacción final 50 μ l. La secuencia base de un cebador para cada uno de los genes, y las condiciones de reacción se dan en la Tabla 4 abajo.

65

TABLA 4

| Genes | Secuencias base de cebadores | Composición PCR | Condiciones PCR |
|--------------------|---|---|--|
| GAPDH | 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (adelante, SEQ ID NO: 1) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (reverso, SEQ ID NO: 2) | | Desnaturalización inicial a 94°C por 2min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. y 72°C por 30 seg.; y extensión final a 72°C por 7min |
| Osteocalcina | 5'-CATGACAGCCCTCACA-3' (adelante, SEQ ID NO: 11) 5'-AGAGCGACACCCTAGAC-3' (reverso, SEQ ID NO: 12) | Plantilla cADN: 5µl Cebadores: 2.5µl, | |
| Osteopontina | 5'-CCAAGTAAGTCCAACGAAAG-3' (adelante, SEQ ID NO: 13) 5'-GGTGATGTCCTCGTCTGTA-3' (reverso, SEQ ID NO: 14) | respectivamente PCR mezcla solución: 7.7µl | |
| Fosfatasa alcalina | 5'- TGGAGCTTCAGAGACTCAACACCA- 3' (adelante, SEQ ID NO: 15) 5'- ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC- 3' (reverso, SEQ ID NO: 16) | | |

Los productos PCR respectivos se sometieron a electroforesis, y los resultados de esta se muestran en la Fig. 12.

Como se muestra en la Fig. 12, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención expresaron todas la osteocalcina, osteopontina y fosfatasa alcalina a partir de una semana después de inducir su diferenciación en los osteocitos. El nivel de expresión de cada uno de los genes se incrementó además con un tiempo de diferenciación más largo.

Por otra parte, el nivel de expresión del gen GAPDH como el control negativo era constante independientemente del pasaje de inducción del tiempo de diferenciación.

Por consiguiente, las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical de la presente invención se pueden diferenciar en los osteoblastos bajo condiciones apropiadas.

Aplicabilidad industrial

Según lo descrito arriba, el método de aislamiento y cultivo celular de acuerdo con la presente invención tiene un efecto de aislar las células troncales/madres mesenquimatosas a partir de la sangre del cordón umbilical mientras que mantienen una pureza alta y viabilidad de las células.

Las células troncales/madres mesenquimatosas, que se aislaron y cultivaron a partir de la sangre del cordón umbilical de acuerdo con la presente invención, se pueden diferenciar en varios tejidos mesenquimatosos, incluyendo condrocitos y osteoblastos, bajo condiciones apropiadas.

Por consiguiente, el método de aislamiento y cultivo celular de acuerdo con la presente invención, y las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical aisladas y cultivadas por consiguiente, son útiles en la renovación y tratamiento de tejidos mesenquimatosos dañados.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el aspirante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aún cuando se ha tomado gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad en este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- KR 1020020008639
- KR 1020030010269

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para el aislamiento, cultivo y condrogénesis de células troncales/madres mesenquimatosas a partir de sangre del cordón umbilical, que comprende las etapas de:

Verter la sangre del cordón umbilical en solución Ficoll-Hypaque;

Centrifugar la sangre del cordón umbilical en la solución Ficoll-Hypaque para obtener células mononucleares;

10 Hacer reaccionar las células obtenidas por cultivo monocapa de las células mononucleares con anticuerpos contra antígenos específicos de células troncales/madres mesenquimatosas por un predeterminado periodo de tiempo de incubación;

15 Aislar solo las células unidas a sus anticuerpos correspondientes utilizando un clasificador celular;

Cultivar las células aisladas; y cultivar en medio de diferenciación celular por un predeterminado periodo de tiempo de incubación las células troncales/madres mesenquimatosas para la diferenciación en condrocitos.

20 2. El método de la reivindicación 1, en donde las células troncales/madres mesenquimatosas se aíslan de las células mononucleares utilizando la especificidad del enlace-anticuerpo para un anticuerpo(s) que es (son) uno o más seleccionados de los anticuerpos contra los antígenos CD105, SH3 y SH4.

25 3. El método de la reivindicación 2, en donde las células troncales/madres mesenquimatosas se **caracterizan** por su habilidad para minimizar la respuesta de rechazo en caso de trasplante de un tejido u órgano.

30 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical, muestran una respuesta positiva a los anticuerpos para los antígenos CD29, CD49e, CD44, CD54, CD13, CD90, SH2, SH3 y SH4, y muestran una respuesta negativa a los anticuerpos para los antígenos CD45, CD34, CD14, HLA-DR, CD31, CD51/61, CD49d, CD106 y CD64.

5. El método de la reivindicación 4, en donde las células troncales/madres mesenquimatosas se **caracterizan** por su habilidad para minimizar el efecto secundario causado por la producción de vasos sanguíneos indeseables o la diferenciación en osteoclastos durante la condrogénesis en caso de trasplantes de tejido u órgano.

35 6. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de diferenciación celular consiste de 10 ng/ml de TGF- β III, 6.25 μ g/ml de insulina bovina, 6.25 μ g/ml de transferina, 5.35 μ g/ml de ácido selenoso, 1.25 μ g/ml de ácido linoleico, 100 μ g/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 100 mM de piruvato de sodio, 100 nM de dexametasona, 50 μ g/ml de ácido ascórbico 2-fosfato y 40 μ g/ml de prolina y un medio de cultivo celular convencional.

40 7. El método de la reivindicación 6, en donde el medio de cultivo celular convencional se selecciona de DMEM, medio β α -MEN, McCoy's 5A, medio basal de Eagle, medio CMRL, medio esencial mínimo Glasgow, medio F-12 de Ham, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio L-15 de Liebovitz y medio 1640 RPMI.

45 8. El método de las reivindicaciones 6 o 7, en donde el medio de diferenciación celular además contiene uno o más auxiliares seleccionados de un factor de crecimiento, suero de caballo o humano, agentes antibióticos y antihongos, incluyendo penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

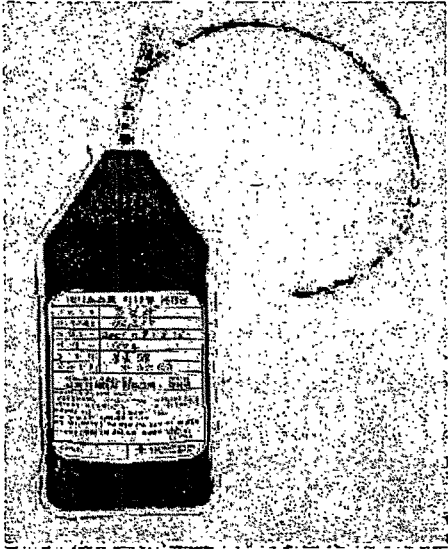
50

55

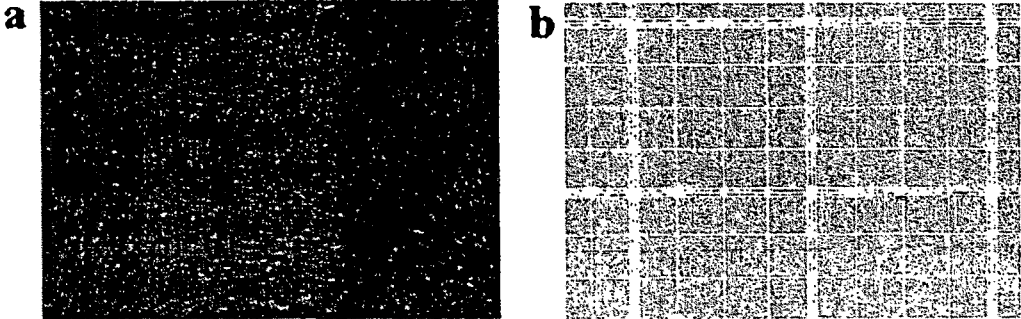
60

65

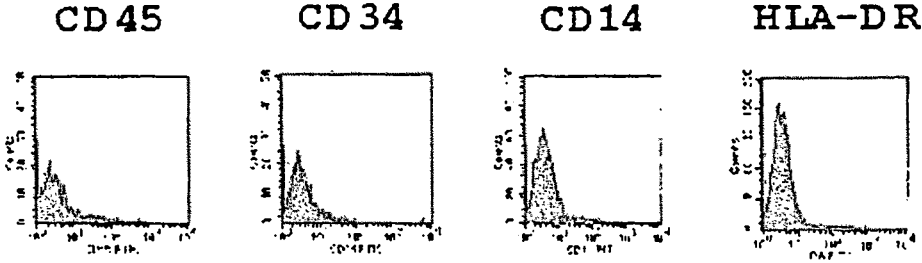
[FIG. 1]



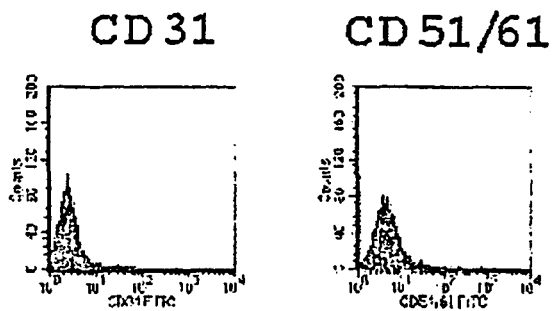
[FIG. 2]



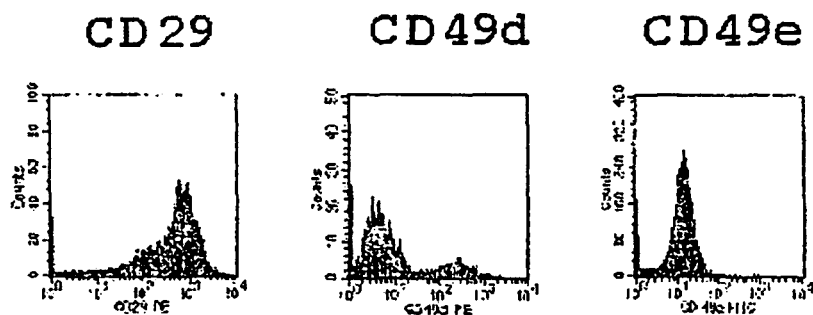
[FIG. 3]



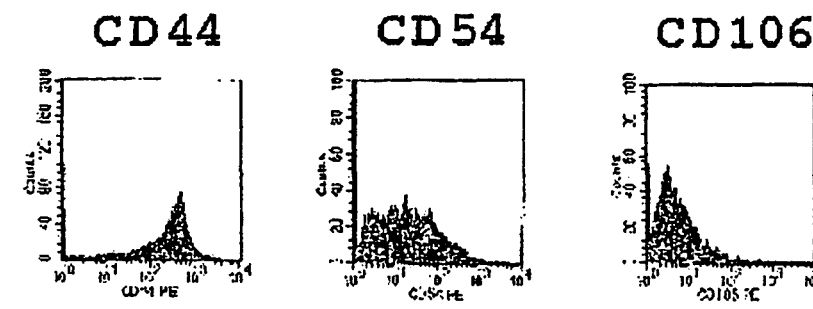
[FIG. 4]



[FIG. 5]



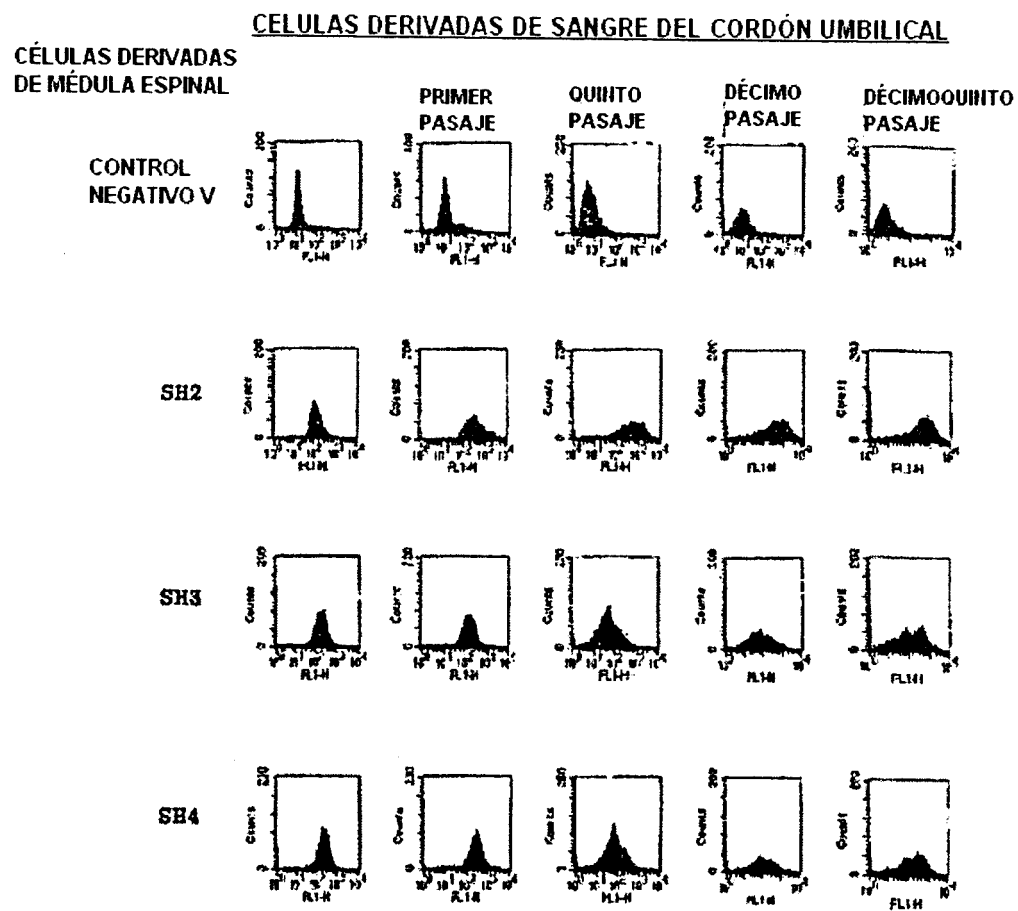
[FIG. 6]



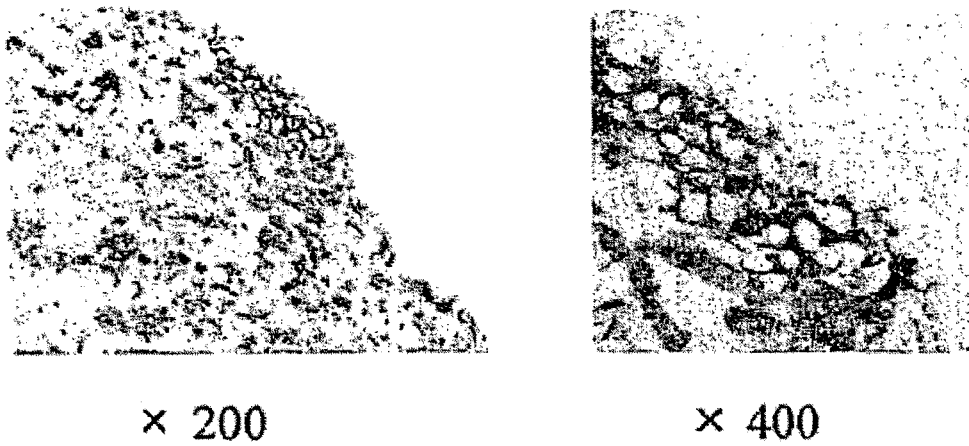
[FIG. 7]



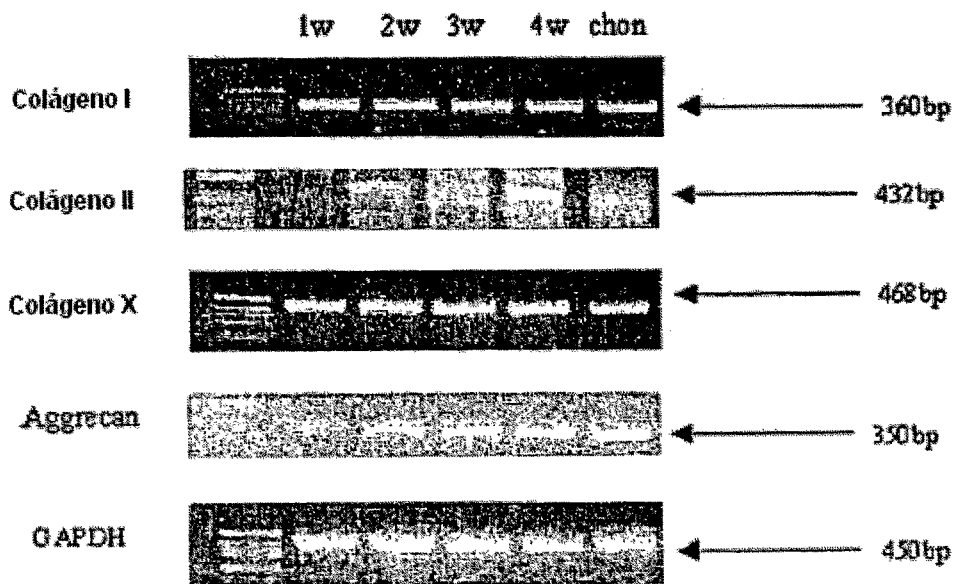
[FIG. 8]



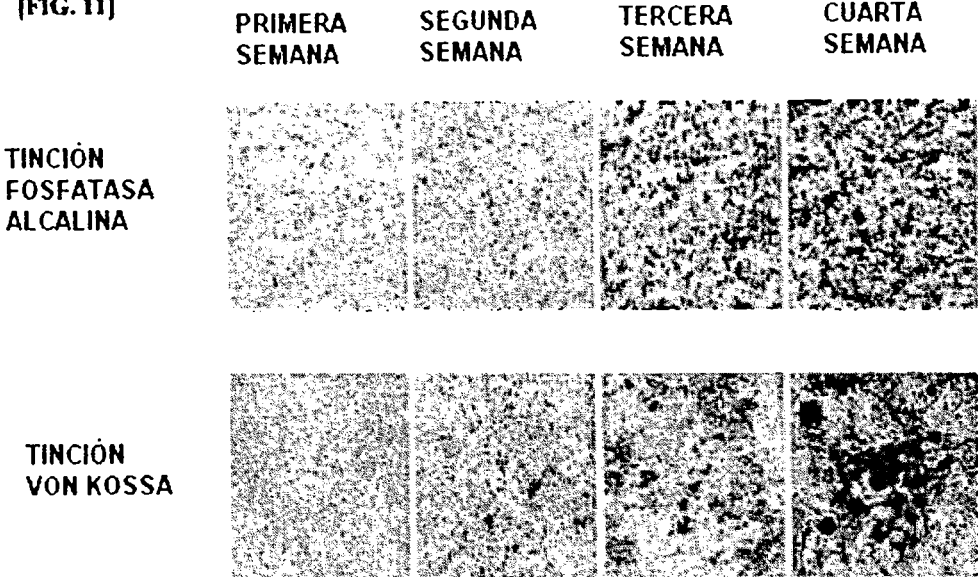
[FIG. 9]



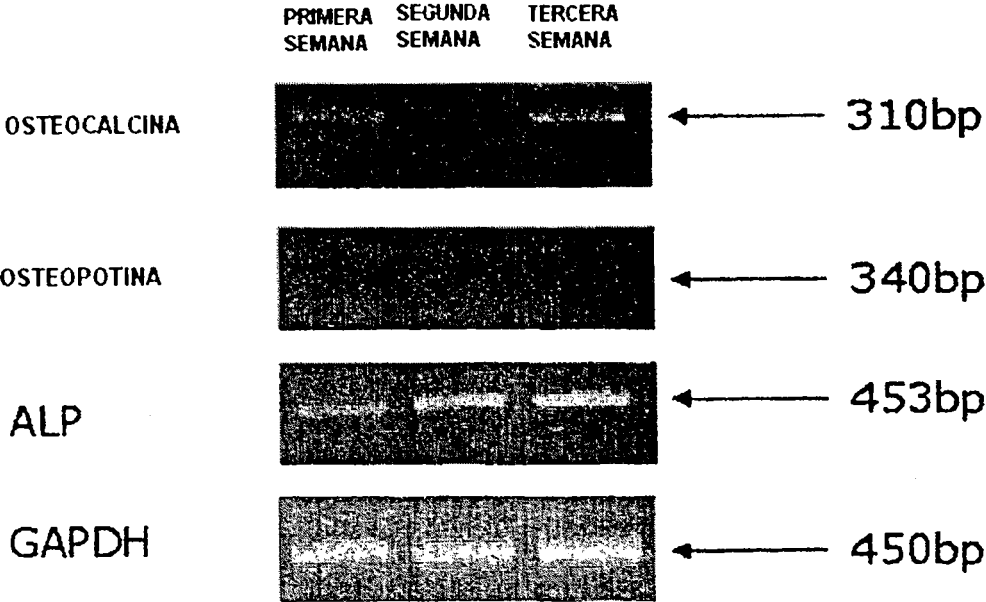
[FIG. 10]



[FIG. 11]



[FIG. 12]



ES 2 287 447 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Medipost
- 5 <120> Métodos de expansión de aislamiento y cultivo de células troncales/madres mesenquimatosas a partir de sangre del cordón umbilical, y método de diferenciación de células troncales/madres mesenquimatosas derivadas de sangre del cordón umbilical en diversos tejidos mesenquimatosos
- <130> 03PP018
- 10 <150> KR 10-2002-0008639
- <151> 2002-02-19
- <150> KR 10-2003-0010269
- <151> 2003-02-19
- 15 <160> 16
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- 20 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 25 <223> cebador hacia adelante para amplificar el gen GAPDH
- <400> 1
- 30 accacagtcc atgcatcac 20
- <210> 2
- <211> 20
- 35 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador reverso para amplificar el gen GAPDH
- 40 <400> 2
- tccaccaccc tgttgctgta 20
- 45 <210> 3
- <211> 21
- <212> ADN
- 50 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador hacia adelante para amplificar el gen de colágeno tipo 1
- 55 <400> 3
- ccccctcccc agccacaaag a 21
- 60 <210> 4
- <211> 21
- <212> ADN
- 65 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador reverso para amplificar el gen de colágeno tipo 1

ES 2 287 447 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <400> 4 | |
| | tcttggtcgg tgggtgactc t | 21 |
| 5 | <210> 5 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 10 | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador hacia adelante para amplificar gen de colágeno tipo 2 | |
| 15 | <400> 5 | |
| | tttcccaggt caagatggtc | 20 |
| 20 | <210> 6 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 25 | <220> | |
| | <223> cebador reverso para amplificar el gen de colágeno tipo 2 | |
| 30 | <400> 6 | |
| | cttcaccacc tgttcacca | 20 |
| 35 | <210> 7 | |
| | <211> 21 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 40 | <220> | |
| | <223> cebador hacia adelante para amplificar el gen de colágeno tipo 10 | |
| | <400> 7 | |
| 45 | ccctttttgc tgctagtac c | 21 |
| | <210> 8 | |
| 50 | <211> 24 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| 55 | <223> cebador reverso para amplificar el gen de colágeno tipo 10 | |
| | <400> 8 | |
| 60 | ctggtgtcca gggtttcctg gcac | 24 |
| | <210> 9 | |
| | <211> 23 | |
| 65 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |

ES 2 287 447 T3

| | | | |
|----|--|--|----|
| | <220> | | |
| | <223> cebador hacia adelante para amplificar el gen aggrecan | | |
| 5 | <400> 9 | | |
| | tgaggagggc tggaacaagt acc | | 23 |
| 10 | <210> 10 | | |
| | <211> 23 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | |
| 15 | <220> | | |
| | <223> cebador reverso para amplificar el gen aggrecan | | |
| | <400> 10 | | |
| 20 | ggaggtgta attgcaggga aca | | 23 |
| | <210> 11 | | |
| 25 | <211> 16 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | |
| 30 | <220> | | |
| | <223> cebador hacia adelante para amplificar el gen osteocalcina | | |
| | <400> 11 | | |
| 35 | catgacagcc etcaca | | 16 |
| | <210> 12 | | |
| 40 | <211> 17 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | |
| 45 | <220> | | |
| | <223> cebador reverso para amplificar el gen osteocalcina | | |
| | <400> 12 | | |
| 50 | agagcgacac cctagac | | 17 |
| | <210> 13 | | |
| | <211> 20 | | |
| 55 | <212> ADN | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | |
| 60 | <220> | | |
| | <223> cebador hacia adelante para amplificar el gen osteopontina | | |
| | <400> 13 | | |
| 65 | ccaagtaagt ccaacgaaag | | 20 |
| | <210> 14 | | |
| | <211> 19 | | |

ES 2 287 447 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| 5 | <223> cebador reverso para amplificar gen osteopontina | |
| | <400> 14 | |
| 10 | ggtgatgtcc tegtctgta | 19 |
| | <210> 15 | |
| | <211> 24 | |
| 15 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| 20 | <223> cebador hacia adelante para amplificar el gen fosfatasa alcalina | |
| | <400> 15 | |
| 25 | tggagcttca gagactcaac acca | 24 |
| | <210> 16 | |
| | <211> 24 | |
| 30 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador reverso para amplificar el gen fosfatasa alcalina | |
| 35 | <400> 16 | |
| 40 | atctcgttgt ctgagtacca gtcc | 24 |
| 45 | | |
| 50 | | |
| 55 | | |
| 60 | | |
| 65 | | |